

Eine neue Methode zur Anreicherung von Katalase
aus Hefe sowie ein Beitrag zur Beschreibung der
Eigenschaften von Hefekatalase

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Moeller

aus Güstrow

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Eine neue Methode zur Anreicherung von Katalase
aus Hefe sowie ein Beitrag zur Beschreibung der
Eigenschaften von Hefekatalase

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Moeller

aus Güstrow

1. Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. B. Drews
2. Referent: Prof. Dr. R. Riemschneider



Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 1969

Tag der Promotion: 8. NOV 1969

Inhaltsverzeichnis

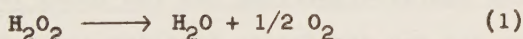
	Seite
1 Einführung	5
2 Problemstellung	9
3 Allgemeiner Teil	10
3.1 Methoden	10
3.1.1 Methoden zur Bestimmung der Katalase-Aktivität	10
3.1.2 Wahl des Substrates	11
3.1.3 Eichkurve	11
3.1.4 Ausführung der Aktivitätsbestimmung von Katalase	12
3.1.5 Proteinbestimmung	14
3.1.6 Ermittlung der optimalen Extraktionsbedingungen	16
3.2 Anreicherung von Hefekatalase aus Backhefe	18
3.2.1 Voranreicherung	19
3.2.2 Gelfiltration über Sephadex G-200-Säulen	20
3.2.3 Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher	23
3.3 Eigenschaften der Hefekatalase	26
3.3.1 Absorptionsspektren	26
3.3.2 Untersuchung der Stabilität	30
3.3.3 Einfluß der Temperatur auf die Katalase-Aktivität	30
3.3.4 Einfluß des pH-Wertes auf die Katalase-Aktivität	31
3.3.5 Untersuchungen zur gehemmten Katalasereaktion	35

3.4	Untersuchungen zur peroxydatischen Reaktion der Hefekatalase	42
3.4.1	Das Wesen der gekoppelten Oxydation	42
3.4.2	Substratabhängigkeit der Enzymkinetik	45
3.4.3	Abhängigkeit der peroxydatischen Wirkung von der Katalasekonzentration	48
3.4.4	Abhängigkeit der peroxydatischen Wirkung von der Substratkonzentration	53
3.4.5	Die Reaktionsprodukte der peroxydatischen Reaktion	60
3.4.5.1	Untersuchung des bei der peroxydatischen Reaktion entstandenen Aldehyds	62
3.4.5.2	Bestimmung des in der peroxydatischen Reaktion nicht umgesetzten Äthanols	63
4	Diskussion	66
5	Zusammenfassung	71
5	Literaturverzeichnis	74

1 Einführung

Die Katalase⁺) ist das am längsten bekannte Enzym. Im Jahre 1818 entdeckte THENARD das Wasserstoffperoxid und beobachtete noch im gleichen Jahr, daß dieses durch verschiedene tierische und pflanzliche Gewebe unter Sauerstoffentwicklung gespalten wird. Bis zu den Arbeiten von RAUDNITZ (1) und LOEW (2), der den Namen Katalase prägte, hielt man diese Spaltungsreaktion für untrennbar mit der lebenden Zelle verbunden. Eine kinetische Deutung erfuhr die Katalasereaktion durch MICHAELIS und MENTEN im Jahre 1913, die die Formulierung eines Enzym-Substrat-Komplexes vorschlugen. Der damals noch hypothetische Komplex konnte von CHANCE (3) bestätigt werden, der das Absorptionsspektrum des nur wenige Bruchteile von Sekunden beständigen Komplexes in einer speziellen Apparatur aufnehmen konnte. ZELLE und HELLSTROEM (4) und STERN (5) konnten die prosthetische Gruppe als Hämin bzw. Protohämin indentifizieren und so die Katalase in die Reihe der Hämoproteide einfügen.

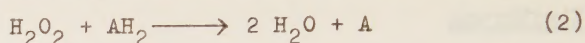
Eine zweite enzymatische Funktion der Katalase konnte durch KEILIN und HARTREE (6) (7) beschrieben werden. Sie entdeckten, daß außer der katalatischen Zersetzung von Wasserstoffperoxid gemäß Gl.1



eine peroxydatische Reaktion durch die Katalase katalysiert werden kann, nach der die Akzeptorfunktion des Wasserstoff-

⁺) Katalase (E.C.1.11.1.6), ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}_2$ - Oxydoreduktase)

peroxids auf einen organischen Akzeptor übertragbar ist:



Diese von ihnen als "gekoppelte Oxydation" bezeichnete Reaktion ist nicht nur von der Anwesenheit eines organischen Akzeptors abhängig, sondern wird im entscheidenden Maße von der stationären Wasserstoffperoxidkonzentration beeinflusst.

Die Katalase ist in der belebten Natur außerordentlich weit verbreitet. Im tierischen und menschlichen Organismus ist sie in vielen Organen zu finden. So sind z.B. Leber, Blut und Nieren sehr reich an Katalase.

Im Bereich der Mikroorganismen konnte Katalase aus *Micrococcus lysodeikticus* (8), *Rhodopseudomonas spheroides* (9) und *Aspergillus niger* (10) isoliert und untersucht werden.

Die Anwesenheit von Katalase in Hefe konnten 1927 v.EULER, FINK und HELLSTROEM (11) nachweisen. Aber erst 1953 gelang es G.L. BROWN (12) ein tausendfach angereichertes Präparat aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zu isolieren und einige Angaben über die Eigenschaften zu liefern. Eine hochgereinigte Hefekatalase gewannen MITSUDA, KAWAI, HAYAMIZU und YASUMOTO (13) auf dem Wege der fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat und Dioxan.

Zur Charakterisierung des von ihnen isolierten Enzyms fertigten sie von der freien Katalase sowie von dem Katalase-Cyanid-Komplex die Absorptionsspektren. Protohäm in wurde von ihnen als die prosthetische Gruppe der Hefekatalase erkannt. Aus dem von den Autoren ermittelten Hämingehalt und der

elektrophoretischen Analyse in der Tissellius-Apparatur, die einen Reinheitsgehalt von 80 % für ihr Präparat ergab, berechneten sie, daß 100 %ige Katalase einen Hämatiningehalt von 1,00 % besitzen müßte. Dieses Ergebnis wird von den Autoren durch die Eisenanalyse gestützt, die einen Fe-Gehalt von 0,073 % erbrachte. Demnach liegt die Hefekatalase gemäß ihres Hämatin-gehalts zwischen den Leberkatalasen und den Erythrocyten- bzw. Bakterienkatalasen.

Katalase Herkunft	Hämatin	Literatur- zitat
Rinderleber	0,46 - 0,54	(14)
Pferdeleber	0,41 - 0,68	(15)
"	0,67 - 0,92	(7)
"	0,89 - 0,91	(16)(17)
Hefe	1,00	(13)
Pferdeblut	1,042	(18)
"	1,08	(16)
Humanblut	0,83	(16)
"	1,15	(19)
Micrococcus lysodeikticus	1,042 - 1,103	(8)
Rhodopseudomonas speroides	wie Micrococcus lysodeikticus	(9)

Tab.1: Hämatiningehalt einiger Katalasen unter-
schiedlicher biologischer Herkunft

Zur weiteren Charakterisierung wurde von MITSUDA und Mitar-
beitern (13) der Einfluß von Cyanid und Azid auf die Hefe-

katalase untersucht, dabei wurde die Hemmung (%) in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration ermittelt und die Halbwertshemmung für beide Inhibitoren bestimmt.

Außerdem wurde die Aktivierungsenergie für die Hefekatalase von MITSUDA und Mitarbeitern (13) berechnet. Sie liegt mit Werten von etwa 2,150 - 2,200 kcal/mol höher als die der Leber-, Blut- oder Bakterienkatalasen.

2 Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, auf den Erkenntnissen von MITSUDA, KAWAI, HAYAMIZU und YASUMOTO (13) aufbauend, die Kenntnisse über die Hefekatalase auszubauen. Die Verwendung von Sephadex-Säulen bei der Auftrennung von Proteingemischen (20)(21)(22), insbesondere die Arbeit von AEBI und Mitarbeitern (23) über die Abtrennung von Katalase und anderen Enzymen aus konzentriertem HämolySAT lassen eine erfolgreiche Anwendung dieser Methode bei der vorliegenden Arbeit erwarten. Substituierte Cellulose-Säulen haben sich ebenfalls in großem Umfang bei der Enzymanreicherung bewährt. So konnten MITZ und YANARI (24), HIGASHI und PETERS (25) und CLAYTON (9) mit dieser Methode Rinderleberkatalase bzw. Katalase aus Rps. spheroides stark anreichern.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll ein modernes Anreicherungsverfahren entwickelt werden, bei dem die Methoden der fraktionierten Fällung und der Säulenchromatographie auch für die Gewinnung von Hefekatalase angewendet werden sollen. Die erhöhte Schwierigkeit gegenüber den anderen Ausgangsmaterialien liegt in der größeren Belastung durch Fremdprotein in der Hefe. Hier soll durch sinnvolle Kombination der Methoden ein optimales Verfahren erarbeitet werden.

Im zweiten Teil soll dann nach der Beschreibung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Hefekatalase das Ausmaß der gekoppelten Oxydation des ÄthanolS zu Acetaldehyd untersucht werden.

Die für die Hefekatalase erzielten Ergebnisse sollen dann mit solchen von Katalasen anderer Herkunft verglichen werden.

3. Allgemeiner Teil

3.1 Methoden

3.1.1 Methode zur Bestimmung der Katalase-Aktivität

Die meisten Aktivitätsbestimmungen der Katalase beruhen auf einer Substratmessung nach erfolgter enzymatischer Reaktion. Dazu ist es nötig, daß nach einer bestimmten Zeitspanne die Reaktion durch Zerstörung des Enzyms oder durch Entzug des Substrates abgebrochen wird, und das nicht umgesetzte Wasserstoffperoxid quantitativ bestimmt wird. Für diese Bestimmung liegen titrimetrische (26)(27) und spektralphotometrische (28)(29)(30)(31)(32)(33)(34) Verfahren vor, von denen sich im allgemeinen die letzteren als überlegen erwiesen haben. Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Methoden geprüft und dabei die von JANICEK und POKORNY (33) und PILZ und JOHANN (34) beschriebene als besonders geeignet ausgewählt. Dieses photometrische Verfahren beruht auf der Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit Titanetetrachlorid in stark salzsaurer Lösung unter Ausbildung eines einheitlichen Farbkomplexes. Der besondere Vorteil dieser Methode liegt darin, daß neben dem Abbruch der Reaktion durch totale Denaturierung des Enzyms in stark saurer Lösung gleichzeitig Substratentzug durch spontane Umsetzung des Reagenzes zur Peroxytitanylverbindung erfolgt. Die Extinktion dieses Farbkomplexes wird bei 415 nm spektralphotometrisch gemessen⁺). Ein weiterer Vorteil ist die Stabilität des Farbkomplexes, der nach mehrstündigem Stehen noch konstante Extinktionen zeigt.

⁺) Alle spektralphotometrischen Untersuchungen wurden am Spektralphotometer Beckman Modell DU ausgeführt.

3.1.2 Wahl des Substrates

Im Zuge der Untersuchungen erwies es sich als günstig, anstelle von Wasserstoffperoxid (p.a. Merck) eine etwa 0,01 M-Natriumperboratlösung als Substrat zu verwenden (35), da so eine höhere Substratstabilität und auch eine geringe Beeinflussung der Katalase durch ihr Substrat erzielt werden konnte.

3.1.3 Eichkurve

Für die Anfertigung einer Eichkurve wurden Perboratlösungen verschiedener Konzentration zwischen 0,5 und 3,5 mg/ml hergestellt. Je 10 ml dieser Lösungen wurden in einem 100 ml-Meßkolben mit 5 ml Ti-Reagenz⁺) versetzt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Extinktionen der einzelnen Farblösungen wurden gegen Wasser bei einer Wellenlänge von 415 nm im Spektralphotometer gemessen und in einer graphischen Darstellung gegen die Perborat-Konzentrationen aufgetragen. Die Verwendung von Wasser als Vergleichslösung ist gerechtfertigt, da zwischen Wasser und einer zwanzigfach verdünnten Reagenzlösung keine Extinktionsdifferenz besteht und weil in allen späteren Messungen ebenfalls gegen Wasser als Vergleich gemessen wird.

⁺) Als Ti-Reagenz wird eine Lösung von 250 ml TiCl_4 in 1000 ml Salzsäure (D 1,19) bezeichnet.

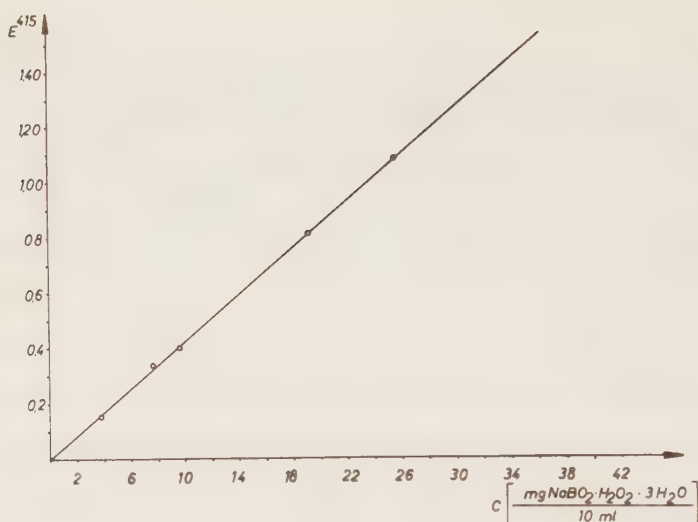


Abb. 1: Eichkurve zur Peroxidbestimmung mit Ti-Reagenz

3.1.4 Ausführung der Aktivitätsbestimmung von Katalase

Für jede Aktivitätsbestimmung ist es notwendig, die Substratkonzentration vor Beginn der Enzymreaktion - zur Zeit t_0 (Nullwert) - und nach Abbruch der Reaktion - zur Zeit t_1 - zu ermitteln. Die praktische Durchführung der Bestimmung erfolgte, indem 10 ml 0,1 M-Perboratlösung mit 25 ml Tris-Puffer⁺⁾ auf 25°C temperiert wurde, dem Gemisch 2 ml Katalaselösung zugesetzt wurde und 1 Minute lang bei 25°C inkubiert wurde. Nach dem Zusatz von 5 ml Ti-Reagenz wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und die Extinktion gegen Wasser bei 415 nm gemessen. Für die Ermittlung des Nullwertes wurde

⁺⁾ Als Tris-Puffer wird im folgenden Tris(hydroxymethyl)-aminomethan / HCl-Puffer, pH 7,2, bezeichnet.

entsprechend verfahren, jedoch erfolgte die Zugabe der Katalaselösung erst nach dem Zusatz von Ti-Reagenz zum Substrat-Puffer-Gemisch.

Da in der Bestimmung mit 2 ml Enzymlösung gearbeitet wurde, die Aktivitätsangabe in Internationalen Einheiten (IE) (36) aber als Substratumsatz in μMol pro ml Enzymlösung und Minute bei 25°C definiert ist, mußten die ermittelten Werte für die Extinktionsdifferenz halbiert werden.

In verschiedenen Veröffentlichungen, namentlich im älteren Schrifttum, erfolgt die Aktivitätsangabe in sog. Kat.f.-Einheiten (Katalasefähigkeit) (26), außerdem existieren in einigen Arbeiten individuelle Enzymeinheiten, wie z.B. sog. Bergmeyer-Einheiten (28) oder Keil-Units.

Die einzelnen Einheiten sind wie folgt definiert:

$$\text{Kat.f.} = \frac{k}{\text{g Untersuchungsmaterial (Trockensubstanz) im 50 ml-Testansatz}}$$

$$k = \frac{1}{\Delta t} \log \frac{S_1}{S_2}$$

dabei bedeuten k = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

t = Reaktionszeit

S_1 = Substratendkonzentration

Die Katalase-Einheit nach Bergmeyer (28) ist die Enzymmenge, die aus einer 10^{-2}M -Wasserstoffperoxidlösung die Hälfte des darin enthaltenen aktiven Sauerstoffs bei 25°C in 100 Sekunden freisetzt. Danach ist diese Einheit gegeben als die Halbwertszeit

$$t_{1/2} = 100 \text{ sec.}$$

Als Keil-Unit ist die Enzymmenge definitiert, die 1 g H_2O_2 in 10 Minuten bei 25°C umsetzt (38).

Tab.2 gibt nach Lück (37) eine Umrechnungsmöglichkeit für die einzelnen Einheiten.

Zur Umrechnung von	in	multiplizieren mit
Kat.f.	Einheiten/mg (n.Bergmeyer)	0,093
	Intern.Einh./mg	1,2
	Keil-Units/mg	0,00044
Einheiten/mg (n.Bergmeyer)	Kat.f.	10,8
	Intern.Einh./mg	13
	Keil-Units/mg	0,0048
Intern.Einh./mg	Kat.f.	0,83
	Einheiten/mg (n.Bergmeyer)	0,077
	Keil-Units/mg	0,00036
Keil-Units/mg	Kat.f.	2300
	Einheiten/mg (n.Bergmeyer)	210
	Intern.Einh./mg	2750

Tab.2: Katalase-Aktivitäten-Umrechnungstabelle

3.1.5 Proteinbestimmung

Die Ermittlung des Proteingehalts erfolgte nach der Biuret-Methode (39), die eine sehr spezifische und genaue

Methode zur Eiweißbestimmung darstellt, mit Rinderserum-albumin (trocken, reinst; Behringwerke, Marburg) als Standard.

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wird folgendes Reagenz hergestellt (39):

9 g Seignette-Salz werden in 400 ml karbonatfreier 0,2 n-NaOH gelöst. Zu dieser Lösung werden 3,0 g feingepulvertes $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (p.a.) gegeben. Nach Lösen des Salzes werden 5,0 g KJ (p.a.) zugesetzt. Die klare Lösung wird mit 0,2 n-NaOH auf 1000 ml aufgefüllt.

Zur Proteinbestimmung wird 1 ml der Probelösung mit 0,15 ml 3 M-Trichloressigsäure versetzt. Nach Abzentrifugieren und sorgfältiger Entfernung des Überstandes wird das Protein in etwa 3 ml Wasser aufgewirbelt, 5 ml Biuret-Reagenz zugesetzt und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Von der nach 30 Minuten (Zimmertemperatur) bei 546 nm gemessenen Extinktion wird der (konstante) Blindwert der Mischung von 5 ml Wasser und 5 ml Biuret-Reagenz abgezogen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den chromatographischen Fraktionen wurde die UV-Absorption der enzymhaltigen Lösung bei 280 nm benutzt (40). Diese Methode hat den Vorteil, daß sie für Reihenuntersuchungen wegen ihrer schnellen Durchführbarkeit gut geeignet ist und außerdem von Salzkonzentrationen unabhängig ist. Sehr wesentlich ist, daß die zur Bestimmung verwendete Probe nicht durch Zusatz von Reagentien für weitere Untersuchungen verdorben ist, was besonders für kleine Fraktionen wichtig ist. Verantwortlich für die Absorption sind die im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren. Da aber der Tryptophan- bzw. Tyrosinanteil bei verschiedenen

Proteinen recht unterschiedlich ist, wurde das Verfahren, um eine bessere Annäherung zu erhalten, mithilfe von Rinderleberkatalase (Kristallsuspension; Boehringer, Mannheim) geeicht. Der Proteingehalt dieser Testsubstanz wurde zuvor nach der Biuret-Methode ermittelt.

3.1.6 Ermittlung der optimalen Extraktionsbedingungen

In einer Reihe von Vorversuchen wurde die günstigste Methode für die Extraktion von Katalase aus Hefezellen ermittelt (41). Dazu wurden einmal intakte Hefezellen mit verschiedenen Pufferlösungen extrahiert und zum anderen Extrakte aus Zellhomogenaten bzw. Plasmolysaten bereitet. Für die Beurteilung der Methode war die Katalase-Aktivität im Rohextrakt entscheidend.

Den Extraktionspuffern wurde Äthylendiamintetraacetat (EDTA) zugesetzt, um der permanenten Gefahr einer Enzymdenaturierung durch eingeschleppte Schwermetallionen zu begegnen. Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß Katalase in Tris-Puffer bei pH 7,2 mit und ohne Zusatz von EDTA keine unterschiedlichen Aktivitäten aufwies. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit denen von LUECK (42), der gleiche EDTA-Konzentrationen anwendete und bei pH 7 im Gegensatz zu höheren Wasserstoffkonzentrationen keine merkliche Hemmung festgestellt hat. Die von BOND und COOPER (43) ermittelte maximale Hemmung durch EDTA bei pH 8,5 konnte nicht bestätigt werden. Nach CHANCE (44) ist die durch EDTA bewirkte und vom pH-Wert abhängige Hemmung dadurch erklärbar, daß nur die undissoziierte Säure, nicht aber das Anion, das bei diesem pH-Wert vorliegt, einen negativen Einfluß auf die Katalase-Aktivität ausübt.

Zur Extraktion von Katalase aus intakten Hefezellen wurden

jeweils 25 g Trockenhefe 3 Stunden mit 100 ml der unten genannten Pufferlösungen⁺⁾ , die alle 0,02 Mol/l EDTA enthielten, bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abzentrifugieren der Hefezellen wurde im Überstand die Katalase-Aktivität bestimmt.

Extraktionspuffer, pH 7,2	Aktivität [IE/ml]
0,05 M-Tris/HCl	40
0,05 M-Triäthanolamin/HCl	35
0,05 M-Imidazol/HCl	28
0,05 M-Veronal-Na/HCl	21

Tab.3: Aktivität im Rohextrakt von intakten Hefezellen, erzielt durch verschiedene Extraktionspuffer. Die Aktivitätswerte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von jeweils drei Extraktionsversuchen, die innerhalb einer Fehlergrenze von 5 % lagen.

Um Katalase aus homogenisierten Hefezellen zu extrahieren, wurden 10 g Trockenbackhefe in 10 ml Tris-Puffer dreimal 15 Sekunden lang im Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) behandelt. Zur Vermeidung von Überhitzung während des Prozesses wurde in das Gerät zur Kühlung flüssiges Kohlendioxid eingeleitet. Dabei kam es nicht zum Einfrieren der Probe. Dem Homogenisat wurden weitere 30 ml 0,05 M-Tris-Puffer zugegeben und anschließend 3 Stunden gerührt. Im abgetrennten Überstand betrug die Aktivität 11 IE/ml, also nur etwa 25 % der durch Extraktion aus intakten Hefezellen gewonnenen.

⁺⁾ Sämtliche Puffer wurden mit bidest. Wasser aus einer Quarzapparatur angesetzt.

Die Extraktion von Katalase aus plasmolysierten Hefezellen wurde folgendermaßen ausgeführt: In einer flachen Porzellanschale wurden 25 g Trockenhefe mit Toluol (Riedel-de Haen; p.a., schwefelfrei) bedeckt und eine Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das organische Lösungsmittel wurde dekantiert, das Autolysat 3 Stunden lang mit 100 ml Tris-Puffer gerührt und dann nach Abzentrifugieren der Überstand im Scheidetrichter von den Resten der organischen Phase befreit. Die Aktivität der wässrigen Phase lag mit 45 IE/ml nicht wesentlich über den Werten, die durch Extraktion aus intakten Hefezellen erzielt wurden, so daß der erhöhte Aufwand nicht gerechtfertigt erschien.

3.2 Anreicherung von Hefekatalase aus Backhefe (Saccharomyces cerevisiae)

Da die Vorversuche ergeben haben, daß Hefekatalase durch Tris-Puffer gut aus intakten Zellen extrahierbar ist, wurden die Rohextrakte für die Enzymanreicherung nach diesem Verfahren gewonnen. Durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung sowie durch Aceton-Fällung konnten wesentliche Voranreicherungen erzielt werden. Erhebliche Aktivitätszunahmen wurden durch Gelfiltration an Sephadex G-200-Säulen und darauf folgende Gradienten-Chromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen^{+) gewonnen. Das Endprodukt besaß eine spezifische Aktivität von 19 300 IE/mg und war in wässriger Lösung dunkelbraun gefärbt. Durch Wiederholung der einzelnen säulenchromatographischen Schritte konnte keine weitere Reinigung erzielt werden. Versuche, durch Chromatographie an Hydroxylapatit (Serva, Heidelberg) zu höheren Aktivitäten zu gelangen, waren erfolglos.}

^{+) DEAE-Cellulose ist O-(Diäthylaminoäthyl)-cellulose}

3.2.1 Voranreicherung

200 g fein gemahlene Trockenhefe wurden in 800 ml 0,05 M-Tris-Puffer (0,02 M-EDTA) suspendiert und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Alle folgenden Arbeiten wurden bei 4°C ausgeführt. Der trübe Überstand wurde unter ständigem Rühren portionsweise bis zur 20%igen Sättigung mit festem Ammoniumsulfat (für biochemische Zwecke, Merck) versetzt. Nach zweistündigem Stehen wurde 30 Minuten bei 30 000 U/min auf der präparativen Ultrazentrifuge (Christ; Modell Omega I) abgeschleudert. Der so bereitete Rohextrakt stellte die Grundstufe für die Anreicherung dar und wird in Tab. 6 als Anreicherungsstufe I registriert. (Eine zweite Extraktion der eingesetzten Hefe führte zu unbedeutenden Katalase-Aktivitäten, wie auch eine Verlängerung der Extraktionsdauer keinen wesentlichen Zuwachs an aktiver Substanz brachte). Der Rohextrakt wird mit Ammonsulfat bis zur 65%igen Sättigung versetzt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Nach dem Zentrifugieren (30 Minuten, 30 000 U/min) enthielt der Überstand keine nennenswerte Katalase-Aktivität mehr. Der Niederschlag wurde in 65 ml 0,005 M-Tris-Puffer aufgenommen, mit 15 ml einer wäßrigen Lösung von 1,6%igem Calciumphosphat-Gel (45) versetzt und eine Stunde stehen gelassen. Der bei 10 000 U/min während 20 Minuten abzentrifugierte Niederschlag wurde verworfen. Der gelb gefärbte Überstand stellte die Anreicherungsstufe II dar und wurde auf seine Katalase-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse der Anreicherung sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Zur Vorbereitung der Aceton-Fällung mußte die Enzymlösung auf -5°C abgekühlt werden, um die Denaturierungsgefahr mög-

lichst weitgehend auszuschalten. Das für die Fällung verwendete Aceton (p.a. Merck) wurde zuvor auf -20°C abgekühlt. Unter ständigem Rühren wurde sehr schnell soviel Aceton in die Lösung getropft, daß die Aceton-Konzentration der Endlösung 45 Vol-% betrug. Bei dieser Behandlung setzte sich ein sehr grobflockiger Niederschlag ab, der sofort auf der Ultrazentrifuge abgeschleudert wurde (10 Minuten, 10 000 U/min). Der Niederschlag wurde in 20 ml 0,005 M-Tris-Puffer suspendiert und 30 Minuten lang gerührt. Dabei blieb ein erheblicher Teil ungelöst zurück, der auf der Ultrazentrifuge abgetrennt wurde (Anreicherungsstufe III in Tabelle 6).

3.2.2 Gelfiltration über Sephadex G-200-Säulen

Die Chromatographiesäule wurde in Anlehnung an die Angaben von FLODIN (46) bereitet. Dazu wurde das Sephadex G-200 (Pharmacia, Upsala) drei Tage lang in 0,005 M-Tris-Puffer gequollen und zwischendurch mehrmals suspendiert und dekantiert, um Schwebeteilchen, die eine Verstopfung der Säule bewirken könnten, zu entfernen. Nach dem Entlüften der Suspension an der Wasserstrahlpumpe wurde das Gel in die temperierbare Kühlmantelsäule (Pharmacia, 2,5 x 100 cm) eingeschlämmt. Die Füllhöhe betrug 85 cm. Vor Inbetriebnahme der Säule wurde mindestens 24 Stunden mit 0,005 M-Tris-Puffer äquilibriert.

Die katalasehaltige Lösung (Anreicherungsstufe III) wurde mit Hilfe eines Auftragbechers auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit 0,005 M-Tris-Puffer mit einer Geschwindigkeit von 20 ml pro Stunde. Die optische Durchlässigkeit des Eluats bei 254 nm wurde kontinuierlich mit einem Durchflußphotometer (Uvicord) registriert, Es wurden etwa 100 Fraktionen

Frakt.	Vol. [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- protein [mg]	Kat.Akt. [IE/ml]	Gesamt- Kat.Akt. [IE]	Spezif. Kat.Akt. [IE/mg]
30	5	0,225	1,125	247	1235	1101
31	5	0,255	1,275	470	2350	1840
32	5	0,277	1,385	690	3450	2490
33	5	0,315	1,575	885	4425	2805
34	5	0,371	1,855	1220	6100	3050
35	5	0,440	2,200	1270	6350	2860
36	5	0,522	2,610	1310	6550	2510
37	5	0,600	3,000	1400	7000	2330
38	5	0,664	3,320	1350	6750	2040
39	5	0,750	3,750	1330	6650	1780
40	5	0,859	4,295	1300	6500	1510
41	5	0,930	4,650	1255	6275	1350
42	5	1,048	5,240	1170	5850	1120
43	5	1,110	5,550	1065	5325	960
44	5	1,205	6,025	810	4050	670

Tab.4: Ergebnisse der Gelchromatographie (Proteingehalt aus der Extinktion bei 280 nm)

zu je 5 ml aufzufangen, Die Katalase-Aktivität erschien im Anstieg des zweiten Proteinpeaks, in der 30. bis 44. Fraktion, und hatte ihr Maximum in der 34. Fraktion. In den Fraktionen 18 bis 27 erschien ein nicht-katalaseaktives Hämoprotein, das aber nicht weiter untersucht wurde. Die Ergebnisse der Gelchromatographie sind in Tab. 4 zusammengefaßt worden.

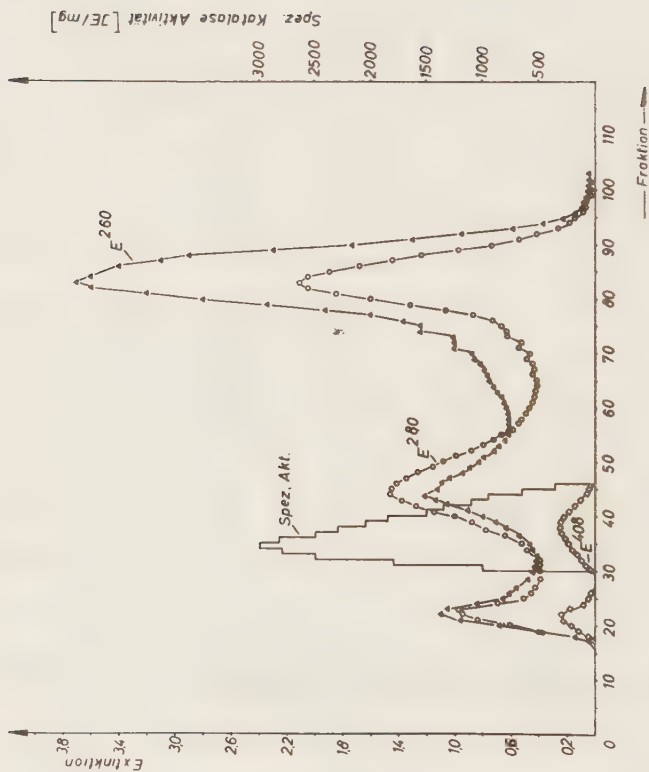


Abb.2: Chromatographie von Hefekatalase der Anreicherungsstufe III an Sephadex G-200. Fraktionsvolumen 5 ml

In den einzelnen Fraktionen wurde nach der oben beschriebenen Methode die Katalase-Aktivität bestimmt und für jede Fraktion die Extinktion bei 260, 280 und 408 nm gemessen (Abb.2).

Nach Vereinigung der aktiven Fraktionen 30 bis 44 wurde wieder bis zu 65 % mit Ammoniumsulfat gesättigt, der Niederschlag 30 Minuten bei 30 000 U/min abgetrennt und in 10 ml 0,005 M-Tris-Puffer aufgenommen. Die Aktivität dieser braunen Lösung wurde als Anreicherungsstufe V in Tab.6 eingetragen.

3.2.3 Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher

Zur Vorbereitung der Säule wurde die DEAE-Cellulose (Serva, Heidelberg) mit etwa 500 ml Wasser angerührt, zur Entfernung der Schwebeteilchen mehrfach dekantiert und das Wasser erneuert. Auf einem Büchner-Trichter wurde die Cellulose abgesaugt und mit 0,1 N-NaOH behandelt. Nachdem mit Wasser neutral gewaschen worden war, erfolgte Behandlung mit 0,1 N-HCl. In der sauren Lösung wurde das Adsorbens nach dem Entlüften an der Wasserstrahlpumpe in die Kühlmantelsäule (2,5 x 45 cm, Pharmacia) gegossen. Nach dem Neutralwaschen mit Wasser wurde nun mindestens 24 Stunden mit 0,005 M-Tris-Puffer äquilibriert und die Säule auf 4°C temperiert.

Die Katalaselösung der Anreicherungsstufe V wurde über einen Auftragsbecher auf die so vorbereitete Säule gegeben und mit 20 ml Tris-Puffer nachgewaschen. Danach wurde mit 120 ml eines linearen Gradienten von 0 - 1 M-NaCl in 0,005 M-Tris-Puffer eluiert und das Eluat in Fraktionen zu je 3 ml (4 Fraktionen pro Stunde) aufgefangen. Der Auslauf wurde, wie bei der Gelfiltration beschrieben, kontrolliert (Tab.5).

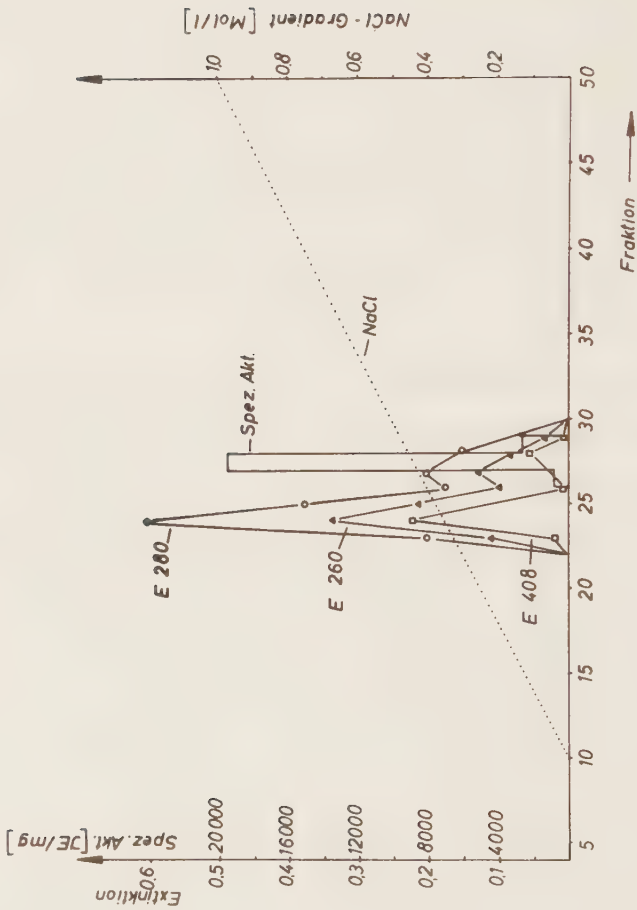


Abb. 3: Chromatographie von Hefekatalase der Anreicherungsstufe V an DEAE-Cellulose. Fraktionsvolumen 3 ml

Die Proteinkonzentration jeder Fraktion wurde aus der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Das Elutionsdiagramm ist in Abb.3 wiedergegeben. Die Katalase-Fraktion der höchsten Aktivitätsstufe erschien in der 28. Fraktion im absteigenden Ast der Proteinkurve. Das in der Tab.5 als Anreicherungsstufe VI bezeichnete Endprodukt wurde nach Entsalzung über eine Sephadex-Glo-Säule (0,9 x 20) für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Frakt.	Vol. [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- protein [mg]	Kat.Akt. [IE/ml]	Gesamt- Kat.Akt. [IE]	Spezif. Kat.Akt. [IE/mg]
23	3	0,209	0,627	0		
24	3	0,630	1,89	0		
25	3	0,40	1,20	0		
26	3	0,18	0,54	12	35	66
27	3	0,197	0,59	167	500	845
28	3	0,12	0,36	2316	6948	19300
29	3	0,06	0,18	160	480	2670

Tab.:5: Ergebnisse der DEAE-Cellulose-Chromatographie

Nach dem beschriebenen Verfahren konnte eine stark angereicherte Hefekatalase mit der spezifischen Aktivität von 19 300 IE/mg gewonnen werden. Die beiden chromatographischen Anreicherungs-schritte waren gut reproduzierbar. Im Verlauf der Arbeit wurden nach den vorliegenden Verfahren unter konsequenter Einhaltung der Bedingungen etwa 50 chromatographische Anreicherungen durchgeführt. Dabei erwies es sich, daß sofern keine Störungen im System vorlagen, die aktiven Fraktionen

stets an etwa gleichbleibender Stelle im Eluat in Erscheinung traten. Die in Tab.6 zusammengefaßten Werte für die Anreicherung stellen Maximalwerte dar, die aber mit Abweichungen zwischen 5 und 10 % bei etwa 80 % aller Katalase-Isolierungen erreicht wurden. Das nach diesem Verfahren gewonnene Enzym besaß allerdings nicht die von MITSUDA u.a. (13) erzielte Aktivität von 32 700 IE/mg. Andererseits gelang es aber auch nicht, nach der von diesen Autoren beschriebenen Methode aus unseren Hefen eine Katalase der genannten Aktivität von 32 700 IE/mg anzureichern. Trotz genauester Einhaltung der Arbeitsvorschrift erfolgte bei diesem Verfahren sehr oft ein erheblicher Aktivitätsverlust in der Stufe der Dioxan-Reinigung. Häufig wurde an dieser Stelle ein Totalverlust der Aktivität festgestellt. Das vorstehend beschriebene Verfahren erwies sich für die Hefekatalase als wesentlich schonender.

3.3 Eigenschaften der Hefekatalase

3.3.1 Absorptionsspektrum

Vom Endprodukt der Anreicherung wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen, das in seinen Hauptpeaks den bekannten Spektren von Hämoproteiden entspricht (12)(13)(47). Es zeigt bei 280 nm den Proteinpeak, bedingt durch die aromatischen Aminosäuren, und bei 408 nm die Soret-Bande, bedingt durch die Hämingruppe.

Die Konzentration der Lösung war jedoch nicht groß genug, um bei Wellenlängen über 500 nm noch meßbare Extinktionen registrieren zu können. Der Wert des Absorptionsspek-

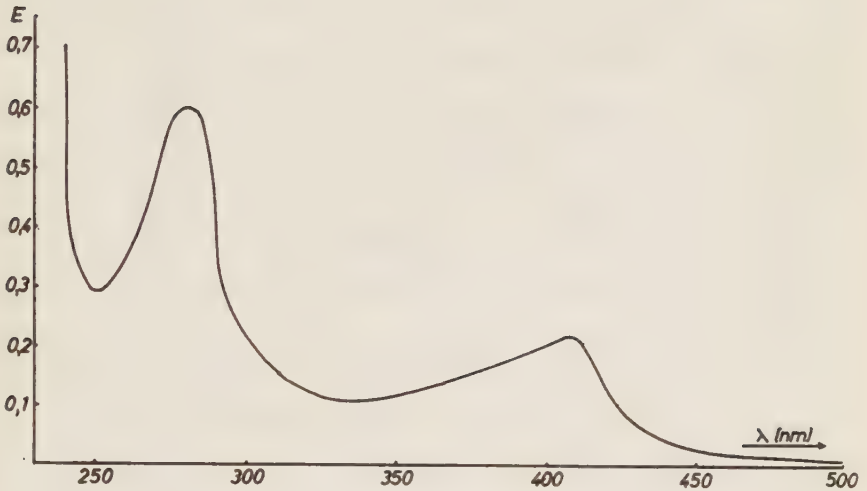


Abb.4: Absorptionsspektrum von Hefekatalase bei pH 7,2

trums liegt jedoch in seinen Extinktionen bei 260, 280 und 408 nm. So erlaubt die Relation der Extinktionen von 260 und 280 nm eine Aussage über die Mengen der im Produkt enthaltenen Nucleinsäure. Denn diese Verbindungsklasse zeigt bei 260 nm eine Extinktion, die wesentlich höher ist als die bei 280 nm, während bei den Proteinen dieses Verhältnis umgekehrt liegt. Außerdem ist aber noch der Extinktionskoeffi-

zient für Nucleinsäure bei 280 nm 10-fach größer als für Proteine bei dieser Wellenlänge (40) (48). Nach WARBURG und CHRISTIAN (40) ist ein Protein bei einem Extinktionsverhältnis $\frac{E_{280}}{E_{260}} = 1,75$ frei von Nucleinsäuren, bei $\frac{E_{280}}{E_{260}} = 1,37$ enthält das Protein noch 1 % Nucleinsäuren. Für das nach oben beschriebenen Verfahren gewonnene Produkt beträgt dieses Extinktionsverhältnis 1,71, demnach darf es als frei von Nucleinsäuren bezeichnet werden.

Als weiteres wesentliches Phänomen im Absorptionsspektrum der Katalase darf das Verhältnis der Extinktionen von 280 zu 408 nm angesehen werden. Sinn der gesamten Anreicherung ist es, Ballast-Eiweiß zu entfernen, was sich in einer Verminderung der Proteinbande bei 280 nm anzeigt. Dadurch nimmt dann die durch die prosthetische Gruppe bedingte Soret-Bande bei 408 nm relativ zu. Bei reiner Katalase muß das Verhältnis von Hämin zu Protein konstant sein, somit auch die Extinktionen der für beide Molekülteile charakteristischen Absorptionen. MITSUDA (13) hat für 100 %ige Katalase die Relation $\frac{E_{280}}{E_{408}} = 1,43$ berechnet. Demnach ist aus dem Extinktionsverhältnis bei diesen Wellenlängen eine Aussage über Reinheit der Katalase ermöglicht. Für das nach beschriebenen Verfahren angereicherte Enzym wurde ein Verhältnis von 2,7 bestimmt, was einer Reinheit^{+) von 53 % entspricht.}

^{+) Das Verhalten der Katalase in der Elektrophorese war Gegenstand einer noch nicht veröffentlichten Diplomarbeit (TU-Berlin). Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Dissertation fehlten außerdem die apparativen Voraussetzungen zur Aufnahme eines Elektropherogramms.}

Anreich. stufe	Reinigungsschritt	Vol. [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- Protein [mg]	Katalase-Aktivität		Anreich. faktor	Aus- beute [%]
					[IE/ml]	gesamt [IE]		
I	Rohextrakt	550	36	19800	146	80200	1	100
II	1. Ammonsulfat- Fällung	65	14	910	448	29120	8	36
III	Aceton-Fällung	20	4	80	1016	20320	64	25
IV	Sephadex G-200 (akt. Fraktion)	5	0,4	2	1220	6100		
V	2. Ammonsulfat- Fällung	10	4	40	924	9240	578	12
VI	DEAE-Cellulose (akt. Fraktion)	3	0,12	0,36	2316	6948	4825	8,7

Tab. 6: Ergebnisse der Anreicherung von Hefekatalase. (Die Differenz zwischen der Aktivitätsstufe I und der in Tab. 1 aufgeführten Aktivität ist darauf zurückzuführen, daß es gelang, im Laufe der Arbeit eine Trockenhefe zu bekommen, die über einen höheren Katalasegehalt verfügte.)

3.3.2 Untersuchung der Stabilität

Das Endprodukt der Enzymanreicherung wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen auf seine Aktivität geprüft. Dabei wurde innerhalb einer Woche kein Aktivitätsverlust festgestellt. Die Hefekatalase dieser Reinigungsstufe erwies sich als wesentlich stabiler als die von BROWN (12) beschriebene, die innerhalb von 3 Stunden bei 4°C und pH 7 ihre Aktivität zu 20% verlor. Ein direkter Vergleich mit der durch MITSUDA u.a. (13) isolierten Katalase ist nur bedingt möglich, da dort nur von Stabilität über mehrere Tage berichtet wird.

3.3.3 Einfluß der Temperatur auf die Katalase-Aktivität

Die Temperaturabhängigkeit der Katalase-Aktivität wurde von MITSUDA u.a. (13) durch Inkubation des Enzyms ohne Substrat im Bereich von 0 bis 30°C und anschließender Aktivitätsbestimmung bei 2°C untersucht. Um den Effekt auf die Aktivität des Enzyms bei steigenden Temperaturen zu ermitteln, wurden aliquote Proben in 0,05 M-Tris-Puffer 20 Minuten bei den Temperaturen 25, 30, 35, 40 und 45°C inkubiert und anschließend schnell abgekühlt. Danach wurde sofort bei 25°C die Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 wiedergegeben. Die Aktivität der bei 25°C inkubierten Probe wurde mit 100% eingesetzt, weil bei dieser Temperatur die internationale Standardisierung festgelegt ist. Zum Vergleich sind die von D. SCOTT und F. HAMMER (10) bei der Untersuchung von *Aspergillus niger* - Katalase erzielten Werte in die Abbildung mit aufgenommen worden.

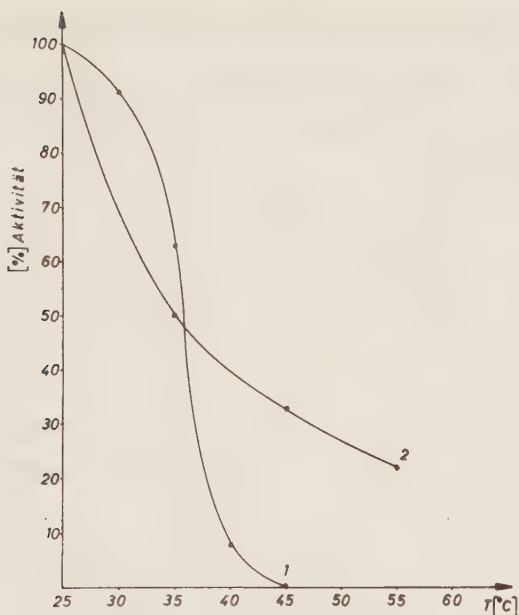


Abb. 5: Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der Katalase
 Kurve 1: Hefekatalase
 Kurve 2: *Aspergillus niger*-Katalase
 nach D. SCOTT und F. HAMMER

3.3.4 Einfluß des pH-Wertes auf die Katalase-Aktivität

Die pH-Abhängigkeit der Enzym-Aktivität wurde von AGNER und THEORELL (18), von BONNICHSEN, CHANCE und THEORELL (27) und von SCOTT und HAMMER (10) für Pferdeleber und Erythrozyten-Katalase untersucht. HERBERT und PINSENT (8) untersuchten diesen Einfluß für *M. lysodeikticus*-Katalase, SCOTT und HAMMER (10) für *A. niger*-Katalase und BAKER (49) für Katalase aus *Penicillium*.

Für die Durchführung dieser Untersuchungen an Hefekatalase wurde eine Probe des nach beschriebenem Verfahren angereicherten Enzyms mit 0,05 M-Tris-Puffer verdünnt und durch Verdünnen in einer abgestuften Pufferreihe in einen pH-Bereich von 3 - 12,5 gebracht. Als Pufferlösungen wurden dabei verwendet:

Citronensäure/Citrat-Puffer	pH 3,0 - 6,2
Imidazol/HCl-Puffer	pH 6,2 - 7,8
Tris/HCl-Puffer	pH 7,2 - 9,0
Glycin/NaOH-Puffer	pH 8,6 - 12,9

Nach 10 Minuten Inkubation bei 40°C und einem pH-Wert zwischen 3,0 und 12,5 wurde die Aktivität der Enzymlösung gemessen. Die pH-Werte der jeweiligen Enzymlösungen wurden elektrometrisch kontrolliert. Die Untersuchungen ergaben, daß die Hefekatalase einen erheblich breiten optimalen pH-Bereich besitzt. In Abb.6 ist die pH-Abhängigkeit der Katalase-Aktivität wiedergegeben.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit die bei extremen pH-Werten beobachtete Aktivitätsverminderung durch Einstellen auf pH-Wert von 7,2 rückgängig gemacht werden kann. Für diese Untersuchungen wurden Proben der oben beschriebenen Katalaselösungen nach der Inkubationszeit von 10 Minuten mit 0,05 M-Tris-Puffer verdünnt und so auf einen neutralen pH-Wert zurückgeführt. In diesem Milieu wurden die Enzymlösungen vor der Aktivitätsbestimmung 20 Minuten inkubiert. Das Ergebnis zeigte eine Reversibilität der Katalase-Aktivität für den Fall, daß eine Restaktivität von mehr

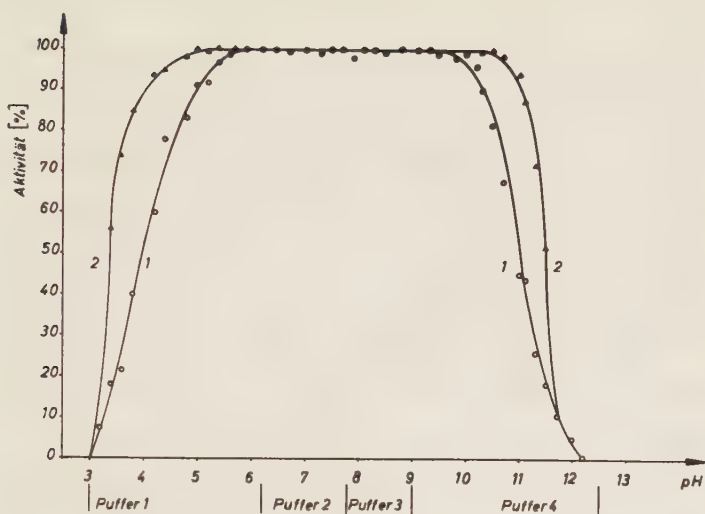


Abb. 6: pH-Abhängigkeit der Katalase-Aktivität

Kurve 1: pH-Optimum von Hefekatalase

Kurve 2: Reversibilität der Katalase-Aktivität

Puffer 1: Citronensäure/Citrat-Puffer

Puffer 2: Imidazol/HCl-Puffer

Puffer 3: Tris/HCl-Puffer

Puffer 4: Glycin/NaOH-Puffer

als 10 % verblieben war. Die bei diesen Bestimmungen erhaltenen Werte sind in die Abb. 6 mit aufgenommen worden.

Um eine weitere Aussage über die Stabilität der Hefekatalase unter extremen pH-Bedingungen machen zu können, wurde die Abhängigkeit der Aktivität von der Inkubationszeit im unteren pH-Bereich über verschiedene Zeiten bei 4°C untersucht. Dazu wurde die neutrale Katalaselösung durch Verdünnen mit Citratpuffer auf pH 3,4 gebracht und in verschiedenen Zeitabständen Proben für die Aktivitätsbestimmung

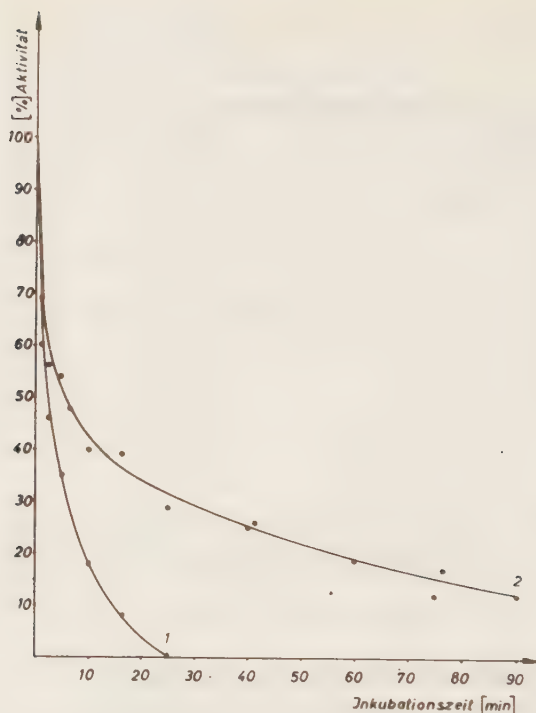


Abb.7: Aktivität der Hefekatalase nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 4°C im unteren pH-Bereich

Kurve 1: Citrat-Puffer pH 3,4
Kurve 2: Citrat-Puffer pH 3,8

entnommen. Nach 15 Minuten Verweilzeit bei pH 3,4 war die Aktivität bereits auf den Wert unterhalb von 10 % der Ausgangsaktivität gesunken, und nach 25 Minuten war keine Aktivität mehr meßbar. Anders lagen die Verhältnisse, wenn die Inkubation nicht bei pH 3,4 , sondern bei 3,8 unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Nach 15 Minuten war noch eine Aktivität von etwa 40 % vorhanden, und nach 60 Minuten lagen noch etwa 20 % der Ausgangsaktivität

vor. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abb.7 dargestellt.

3.3.5 Untersuchungen zur gehemmten Katalasereaktion

Von den unterschiedlichsten chemischen Verbindungen, die als Katalase-Inhibitoren bekannt geworden sind, sind die Cyanid-, Fluorid- und Azidverbindungen am häufigsten untersucht worden. Für die Hefekatalase sind von BROWN (12) und von MITSUDA u.a. (13) die Beziehungen zwischen Hemmungsgrad und Inhibitorkonzentration beschrieben worden, wobei die Untersuchungen an Cyanid- und Azidkomplexen durchgeführt worden sind. Die von ihnen erzielten Ergebnisse konnten anhand eigener Versuche für die vorliegende Hefekatalase-Präparation bestätigt werden.

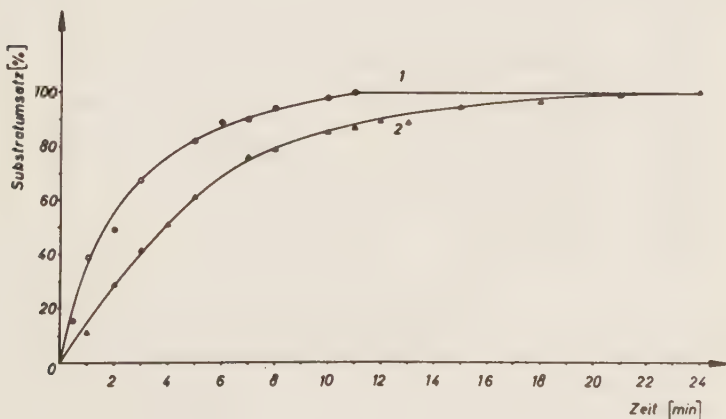


Abb.8: Zeit-Umsatz-Kurve für ungehemmte (1) und gehemmte (2) Reaktion

Es wurden für die ungehemmte und für die cyanidgehemmte Katalasereaktion die Zeit-Umsatz-Kurven aufgenommen. Bei der gewählten Cyanidkonzentration wurde z.B. der 50 %ige Substratumsatz bei der doppelten Zeit, im Vergleich zur ungehemmten Reaktion, erreicht. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante war bei der gehemmten Reaktion um etwa 50 % gemindert.

Zeit (min)	E^{415}	$E_a - E_{a-x}$	Substrat- umsatz (%)	$\frac{E_a}{E_{a-x}}$	$\log \frac{E_a}{E_{a-x}}$
0	0,82	0	0	1	0
0,5	0,69	0,13	15,85	1,19	0,076
1	0,50	0,32	39,0	1,64	0,215
2	0,42	0,40	48,8	1,95	0,290
3	0,27	0,55	67,1	3,03	0,481
5	0,15	0,67	81,7	5,45	0,737
6	0,09	0,73	89,0	9,10	0,959
7	0,08	0,74	90,0	10,5	1,021
8	0,05	0,77	94,0	16,4	1,215
10	0,02	0,80	97,5	41,0	1,614
11	0	0,82	100	∞	

Tab.7: Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Reaktionslaufzeit für die ungehemmte Reaktion

Für die Aufnahme der Zeit-Umsatz-Kurven wurde wie folgt verfahren: Zu 5 ml verdünnter Katalaselösung wurden 0,5 ml einer $1 \cdot 10^{-3}$ M-KCN-Lösung gegeben und 5 Minuten bei 40°C vorinkubiert. Danach wurden aus dem Enzym-Hemmstoff-Gemisch

2 ml entnommen und zu einer auf 25°C temperierten Substratlösung aus 10 ml Perboratlösung (19,3 mg) und 25 ml Tris-Puffer gegeben. Nach verschiedenen langen Reaktionszeiten wurde die Katalasereaktion wie üblich mit Ti-Reagenz abgebrochen und der Substratgehalt ermittelt.

Zeit (min)	E^{415}	$E_a - E_{a-x}$	Substrat- umsatz (%)	$\frac{E_a}{E_{a-x}}$	$\log \frac{E_a}{E_{a-x}}$
0	0,82	0	0	1	0
1	0,73	0,09	11,0	1,12	0,049
2	0,58	0,24	29,3	1,41	0,149
3	0,48	0,34	41,5	1,71	0,233
4	0,40	0,42	51,2	2,05	0,312
5	0,32	0,50	61,0	2,56	0,408
7	0,20	0,62	75,6	4,10	0,613
8	0,18	0,64	78,0	4,55	0,658
10	0,12	0,70	85,5	6,83	0,835
11	0,11	0,71	86,5	7,45	0,873
12	0,09	0,73	89,0	9,10	0,960
13	0,09	0,73	89,0	9,10	0,960
15	0,05	0,77	94,0	16,4	1,215
18	0,03	0,79	96,4	27,3	1,435
21	0,01	0,81	99,0	82,0	1,915
24	0	0,82	100	∞	

Tab.8: Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Reaktionslaufzeit für die gehemmte Reaktion

Für die ungehemmte Katalasereaktion wurde in entsprechender Weise verfahren. Statt des Enzym-Hemmstoff-Gemisches wurde hier ein Enzym-Puffer-Gemisch von gleicher Konzentration eingesetzt. Die Abhängigkeiten der Substratrestkonzentration von den Reaktionszeiten sind in den Tabellen 6 und 7 wiedergegeben.

Da die Katalasereaktion als Reaktion 1. Ordnung abläuft, können über die Beziehung

$$k \cdot t = \ln \frac{a}{a-x}$$

$$\text{oder } k' \cdot t = \log \frac{a}{a-x} = \log \frac{E_a}{E_{a-x}}$$

aus den gemessenen Extinktionen die Geschwindigkeitskonstanten ermittelt werden. Es bedeuten:

- a = Anfangskonzentration
- $a - x$ = Restkonzentration
- t = Reaktionszeit
- k' = Geschwindigkeitskonstante
- E_a = Extinktion von a
- E_{a-x} = Extinktion von $a-x$

In Abb. 9 ist die Abhängigkeit des dekadischen Logarithmus des Konzentrationsverhältnisses $\frac{a}{a-x}$ von der Reaktionszeit dargestellt. Die jeweilige Steigung der Geraden ist die Geschwindigkeitskonstante k' .

Ein weiterer Versuch hatte zum Ziel, nach der Vorinkubation den Inhibitor aus der Katalaselösung zu entfernen,

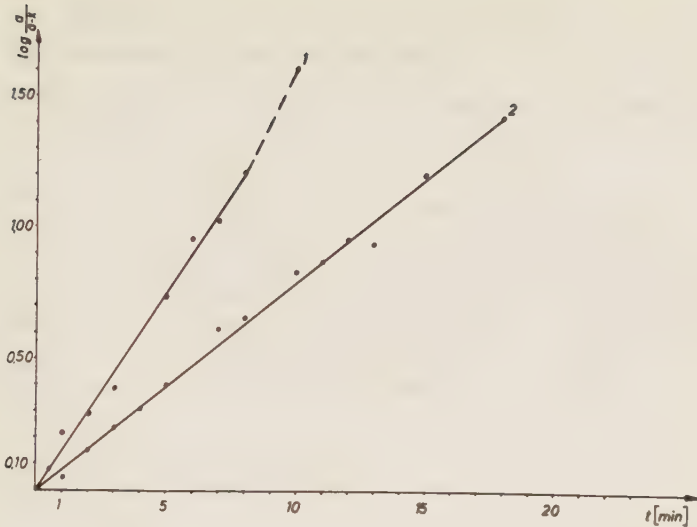


Abb. 9: Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k' aus der Beziehung $\log \frac{a}{a-x} = k' \cdot t$ für die ungehemmte (1) und die cyanidgehemmte (2) Katalasereaktion

$$k_1' = 0,153$$

$$k_2' = 0,080$$

um dann den Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve in Abwesenheit des Inhibitors zu verfolgen. Aus diesem Grunde wurde der vorinkubierten Lösung Silbernitrat zugesetzt. Mit dieser Enzymlösung wurde dann wie oben der Substratumsatz über verschiedene Zeiten verfolgt. Dabei ergab sich eine Zeit-Umsatz-Kurve, die knapp unterhalb derjenigen für die ungehemmte Reaktion lag. In einem Vorversuch konnte festgestellt werden, daß die verwendete Silbernitratkonzentration

keinen Einfluß auf die Katalase-Aktivität hatte. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Hemmung mit Cyanid durch Silberionen wieder vollkommen aufgehoben wird.

Die Inhibitorwirkung von Hydroxylamin auf Katalasen animalischer Herkunft ist von NICHOLLS (50) beschrieben worden. Da in den Untersuchungen zurperoxydatischen Reaktion der Hefekatalase Hydroxylamin zum Abbruch der Enzymreaktion verwendet werden soll, ergab sich die Notwendigkeit, die erforderlichen Inhibitorkonzentrationen zu ermitteln. Es wurde der Hemmungsgrad in Abhängigkeit von der Hydroxylamin-Konzentration bestimmt.

Reaktion	$\begin{bmatrix} [I] \\ \text{Mol/ml} \\ \text{Enzym-} \\ \text{Lsg.} \end{bmatrix}$	$-\log I$	E_{a-x}^{415}	$E_a - E_{a-x}$ ΔE	$\Delta E_{I_0} - \Delta E_I$	Hemmung [%]
gehemmte Reaktion	$1 \cdot 10^{-8}$	8	0,17	0,65	0,04	5,8
	$1 \cdot 10^{-7}$	7	0,25	0,57	0,12	17,4
	$1 \cdot 10^{-6}$	6	0,58	0,24	0,45	65,2
	$1 \cdot 10^{-5}$	5	0,79	0,03	0,66	95,7
	$1 \cdot 10^{-4}$	4	0,82	0	0,69	100
ungehemmte Reaktion (I_0)	0	-	0,13	0,69	-	0
Null- reaktion	0	-	0,82	0	-	100

Tab.9: Abhängigkeit der Hemmung von der Inhibitorkonzentration [I]

Die Nullreaktion gibt den Substratgehalt zur Zeit $t = 0$ an, der gleichzeitig Bezugswert für die 100 %ige Hemmung ist.

Für die Durchführung dieser Untersuchungen wurde wie folgt verfahren: 25 ml Tris-Puffer und 10 ml Perboratlösung (19,3 mg) wurden auf 25°C temperiert. Danach wurden jeweils 2 ml Enzym-Inhibitor-Gemisch mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration zugesetzt und 1 Minute inkubiert. Nach Reaktionsabbruch mit Ti-Reagenz wurde photometrisch der jeweilige Substratgehalt ermittelt. Die Meßwerte und Ergebnisse in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration sind in Tab.9 zusammengefaßt und in Abb.10 dargestellt.

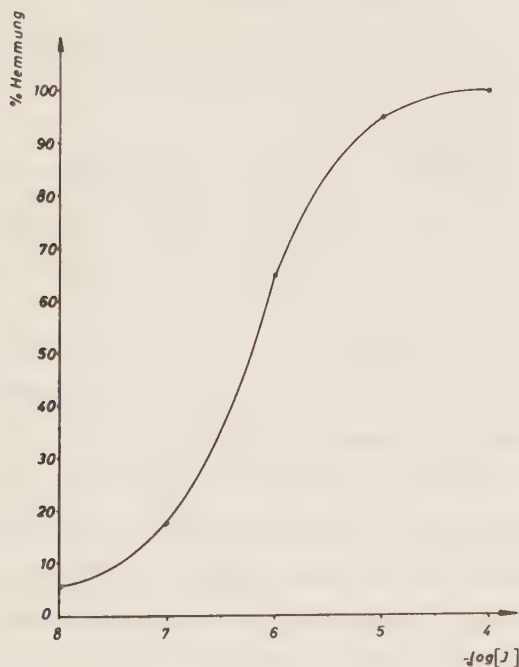


Abb.10: Hemmung der Katalase-Aktivität durch Hydroxylamin

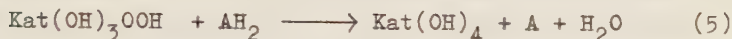
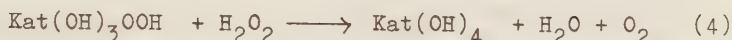
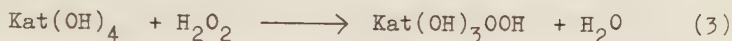
Aus den Untersuchungen geht hervor, daß nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-7}$ Mol Hydroxylamin eine 50 %ige Hemmung vorliegt. Nach Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf $1 \cdot 10^{-4}$ Mol pro ml Enzymlösung ist die Katalase in ihrer Aktivität vollständig gehemmt.

3.4 Untersuchungen zur peroxydatischen Reaktion der Hefekatalase

3.4.1 Das Wesen der gekoppelten Oxydation

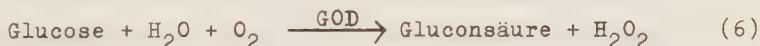
Die bisher untersuchten Eigenschaften der Katalase beruhen auf der katalytischen Zersetzung von Wasserstoffperoxid unter Bildung von Wasser und Sauerstoff, der sogenannten katalatischen Reaktion. Aufgrund der Untersuchungen von KEILIN und HARTREE (5) (6) kann der Katalase eine zweite Reaktionsmöglichkeit zugeordnet werden. Danach ist sie imstande, in Gegenwart von Wasserstoffdonatoren eine peroxydatische Funktion zu übernehmen, d.h., sie kann wie die Peroxydase den Sauerstoff auf einen organischen Acceptor übertragen. Aus dem von CHANCE untersuchten Reaktionsmechanismus ist ersichtlich, wie der Wasserstoffdonator (Sauerstoffacceptor) das Wasserstoffperoxid aus seiner Funktion verdrängen kann und somit einen neuen Reaktionsweg einzuleiten vermag. Gemäß Gl.3 wird der Primärkomplex gebildet, der nach Gl.4 als katalatische Reaktion in das Enzym und die Produkte Wasser und Sauerstoff zerfällt. Andererseits kann der Primärkomplex entsprechend Gl.5 in

peroxydatischer Reaktionsweise in die Komponenten zerfallen:



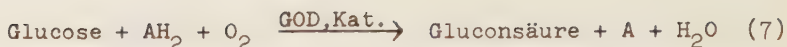
Für den Fall, daß der Wasserstoffdonator Äthanol ist, ist sein Oxydationsprodukt Acetaldehyd. Die unterschiedlichen Produkte der beiden Reaktionen (4) und (5) ermöglichen es, den Verlauf manometrisch zu verfolgen und so eine Aussage über den Reaktionstyp machen zu können.

Eine weitere Voraussetzung für den Ablauf der peroxydatischen Reaktion ist eine sehr niedrige Substratkonzentration, die bei etwa $1 \cdot 10^{-9} \text{M-H}_2\text{O}_2$ liegen muß (51). Diese niedrigen Konzentrationen stehen zur Verfügung und sind experimentell zugänglich, wenn das Peroxid innerhalb des Reaktionssystem enzymatisch entwickelt wird, z.B. durch das System Glucose/Glucoseoxydase ⁺).

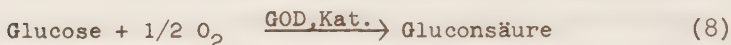
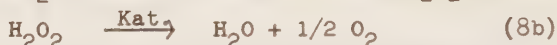


Durch dieses System ist eine gleichbleibend niedrige stationäre Wasserstoffperoxidkonzentration gegeben, da das Primärprodukt (H_2O_2) sofort nach der Bildung umgesetzt wird, sich also nicht anreichern kann. Wenn außerdem noch die Konzentration des Donators und der Katalase groß genug sind, so wird die katalatische Reaktion vollständig unterdrückt und die Gesamtreaktion kann wie folgt formuliert werden:

⁺) Glucoseoxydase = GOD



Aus der Gegenüberstellung von peroxydatischer (Gl.7) und katalatischer Reaktion (Gl.8)



ist ersichtlich, daß die Sauerstoffaufnahme bei der peroxydatischen Reaktion doppelt so groß ist wie bei der katalatischen. Aufgrund dieser Tatsache können beide Reaktionen manometrisch unterschieden werden.

KEILIN und HARTREE konnten bei ihren Untersuchungen über die gekoppelte Oxydation feststellen, daß verschiedene Alkohole mehr oder weniger gut als Wasserstoffdonatoren geeignet waren. So zeigten Methanol und Äthanol die größte Donatorwirkung, während n-Propanol und Isopropanol schon weniger geeignet waren und niedrige O_2 -Werte zeigten. Höhere Alkohole zeigten unter den gewählten Bedingungen keine Donatoreigenschaften. Überraschenderweise verlief bei Verwendung von Methanol die Oxydation über die Stufe des Formaldehyds hinaus zur Ameisensäure und zum Kohlendioxid, während beim Äthanol die Oxydation auf der Aldehydstufe abbrach.

Die Untersuchungen der peroxydatischen Eigenschaften wurden bisher an Leber- und Blutkatalasen durchgeführt. HERBERT und PINSENT (8) und CLAYTON (9) ergänzten diese Erkenntnisse durch ihre Untersuchungen an Bakterienkatalasen. Grundsätzliche Unterschiede wurden dabei nicht erkannt, le-

diglich in den Reaktionsgeschwindigkeiten für die einzelnen Teilschritte der peroxydatischen Reaktion konnten Abweichungen festgestellt werden. Die Werte für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten liegen bei den animalischen Katalasen um ein Vielfaches höher als bei den Bakterienkatalasen.

Im folgenden soll die Hefekatalase auf ihre peroxydatische Eigenschaft untersucht werden und dabei ein Vergleich zu den Katalasen anderen Ursprungs gezogen werden.

3.4.2 Substratabhängigkeit der Enzymkinetik

Für die Untersuchung des Substrateinflusses auf die Enzymkinetik wurde Hefekatalase in Gegenwart von Äthanol als Wasserstoffdonator mit Wasserstoffperoxid (Perhydrol, Merck) mit Natriumperborat oder mit enzymatisch erzeugtem Wasserstoffperoxid zur Reaktion gebracht. Die Ausführung dieser Versuche erfolgte in der Warburg-Apparatur⁺⁾ , wobei der Sauerstoffumsatz manometrisch bei konstantem Reaktionsvolumen gemessen wurde. Die Arbeitstemperatur betrug 25°C. Für die Durchführung der Untersuchungen wurde Katalaselösung der Anreicherungsstufe VI verwendet. Für die Wasserstoffdonatorlösung wurden 500 mg Äthanol (Merck) mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Substratlösungen wurden bereitet, indem 0,1 ml Perhydrol oder 153,9 mg $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ mit bidest. Wasser jeweils auf 100 ml aufgefüllt wurden (0,01 mMol/ml) oder indem für die Wasserstoffperoxid erzeugende Enzymreaktion Glucoseoxydase-Lösung (0,1 mg/ml Tris-Puffer) und Glucoselösung (15 mg/ml Wasser) hergestellt wurde.

⁺⁾ Warburg, Apparatur, Modell V 85; Braun, Melsungen;
Gefäße Modell A 05-00

Zur Versuchsausführung wurden in den Reaktionsgefäßen 1a - 2b die Katalaselösungen in die Ansatzbirne pipettiert, während die anderen Lösungen in den Hauptraum

Lösungen (ml)	Reaktionsansätze					
	1a	1b	2a	2b	3a	3b
Katalase	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Äthanol	-	0,46	-	0,46	-	0,46
H ₂ O ₂	2,00	2,00	-	-	-	-
Na-Perborat	-	-	2,00	2,00	-	-
GOD	-	-	-	-	0,50	0,50
Glucose	-	-	-	-	0,20	0,20
Tris-Puffer	0,90	0,44	0,90	0,44	2,20	1,74

Tab.10: Versuchsansätze für die manometrischen Messungen (0,46 ml Äthanol-Lösung obiger Konzentration entsprechen 50 µMol Äthanol)

der Gefäße gegeben wurden. Für die Ansätze 3a und 3b wurden die Birnen mit der Glucoselösung beschickt. Nach dem Temperieren der so gefüllten Gefäße wurden durch die Vereinigung der Lösungen die Enzymreaktionen ausgelöst. Nach Schließen der Manometerhähne wurden in Abständen von 5 Minuten die Manometerstände abgelesen und nach Korrektur durch Leerwert und Thermobarometer unter Verwendung der Gefäßkonstanten der Sauerstoffverbrauch bzw. die Sauerstoffentwicklung berechnet. Die sich aus den Messungen ergebenden Werte für den Sauerstoffumsatz wurden in Abhängig-

keit von der Versuchszeit in den Abbildungen 11a und 11b dargestellt.

Aus dem Verlauf der Kurven ist ersichtlich, daß nur unter Verwendung von Glucoseoxydase/Glucose (Abb.11b, Kurve 3a) die peroxydatische Funktion der Katalase in

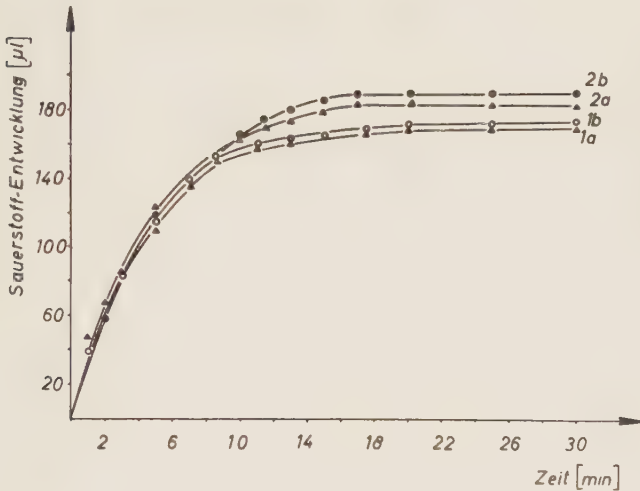


Abb.11a: Abhängigkeit der katalytischen Funktion der Katalase von der Art des Substrats

Kurve 1a: H_2O_2 + Katalase

Kurve 1b: H_2O_2 + Katalase + Äthanol

Kurve 2a: $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ + Katalase

Kurve 2b: $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ + Katalase + Äthanol

Erscheinung tritt, da nur dann gemäß Gl.7 der doppelte Sauerstoffanteil verbraucht wird. Die Reaktionen mit Natriumperborat oder mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Äthanol (Abb.11a) erfolgen nicht nach dem peroxyda-

tischen Mechanismus. Die Kurvenbilder 1b und 2b, die diese Reaktionen wiedergeben, zeigen, daß freier Sauerstoff als Folge der katalatischen Zersetzung von Wasserstoffperoxid gemessen worden ist. In den Reaktionen 1 und 2 wird der Reaktionsablauf durch die Anwesenheit von Äthanol also nicht beeinflußt.

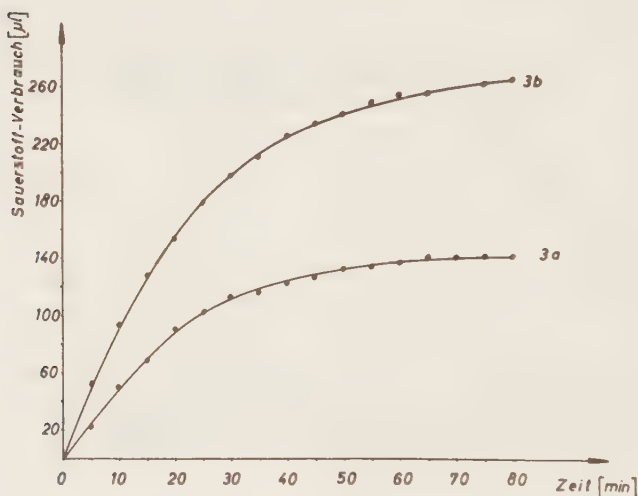


Abb.11b: Abhängigkeit der katalytischen Funktion der Katalase von der Art des Substrats
Kurve 3a: Glucose + GOD + Katalase
Kurve 3b: Glucose + GOD + Katalase + Äthanol

3.4.3 Abhängigkeit der peroxydatischen Wirkung von der Katalase-Konzentration

Für die Untersuchung der gekoppelten Oxydation der Hefekatalase ist es von wesentlichem Interesse, den Konzentrationsgrenzwert zu ermitteln, bei dem die Katalase

ihre Funktion von der katalatischen auf die peroxydatische Reaktion umstellt. Aus diesem Grunde wurden unter Verwendung verschiedener Katalase-Konzentrationen manometrische Messungen im GOD-System in Gegenwart von Äthanol als Wasserstoffdonator durchgeführt.

Bei der Ausführung dieser Versuche wurden außer der Katalase alle anderen Komponenten in ihrer Konzentration konstant gehalten. Die Arbeitstemperatur betrug 25°C. Als Wasserstoffdonator wurden 500 mg Äthanol ad 100 ml bidest. Wasser gelöst. Zur Substratbereitung im Reaktionssystem wurden eine Glucoselösung der Konzentration 15 mg/ml Wasser und eine GOD-Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml Tris-Puffer hergestellt. Die Katalase der Anreicherungsstufe VI wurde mit Tris-Puffer auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt. Zunächst wurde aus 1,5 ml Katalaselösung VI und 1,5 ml Tris-Puffer die Stammlösung A (1150 IE/ml) erhalten. 1 ml Stammlösung A wurde mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt und ergab die Stammlösung B. Statt der Konzentrationsangabe wurde die Katalase-Gesamtaktivität im System als Bezugsangabe verwendet.

Die Ergebnisse der manometrischen Untersuchungen sind in Abb.12 dargestellt. Die Bezifferung der einzelnen Kurven entspricht denen der Versuchsansätze.

In dieser Abbildung ist deutlich erkennbar, daß in den Ansätzen 11 und 12 der doppelte Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu Ansatz 1 vorliegt. Bei diesen hohen Katalase-Konzentrationen ist die katalatische Reaktion völlig zugunsten der peroxydatischen verdrängt. Andererseits ist

trotz Anwesenheit des Wasserstoffdonators kaum eine peroxydatische Reaktion im Katalasebereich bis zu 5,8 IE/Ansatz zu erkennen. Die Kurven 4 - 7 zeigen kaum erhöhten Sauerstoffverbrauch.

Probe	Äthanol	Glucose (ml)	GOD (ml)	Katalase		Tris Puffer
	(ml)			(ml)	(IE)	
1	-	0,20	0,50	0,5	575	1,8
2	-	0,20	0,50	0,05	57,5	2,25
3	-	0,20	0,50	0,025	0,3	2,275
4	0,46	0,20	0,50	0,025	0,3	1,815
5	0,46	0,20	0,50	0,05	0,6	1,79
6	0,46	0,20	0,50	0,25	2,9	1,59
7	0,46	0,20	0,50	0,5	5,8	1,34
8	0,46	0,20	0,50	0,025	29	1,815
9	0,46	0,20	0,50	0,05	57,5	1,79
10	0,46	0,20	0,50	0,25	288	1,59
11	0,46	0,20	0,50	0,5	575	1,34
12	0,46	0,20	0,50	0,75	863	1,09

Tab. 11: Versuchsansätze für die manometrischen Messungen zur Untersuchung der Abhängigkeit des Sauerstoffumsatzes von der Katalasekonzentration. Die Volumina der Katalaselösungen in den Ansätzen 1, 2 und 8 - 12 beziehen sich auf die Stammlösung A, die der Ansätze 3 - 7 auf die Stammlösung B.
0,46 ml Äthanol obiger Konzentration entsprechen 50 μ Mol Äthanol

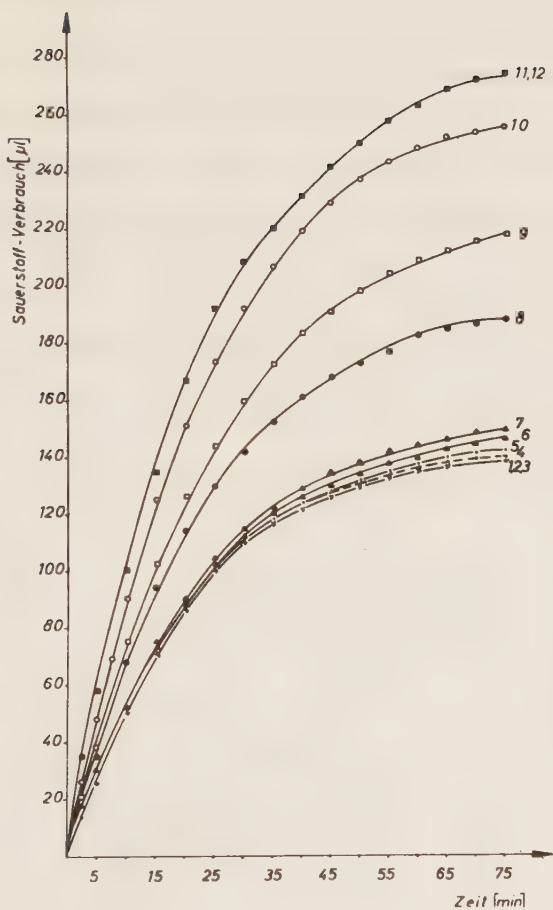


Abb. 12: Manometrische Untersuchungen der Katalasereaktion im GOD-System in Gegenwart von Athanol für verschiedene Katalase-Konzentrationen

In den Ansätzen 8, 9 und 10 mit den Katalasegehalten von 29 - 288 IE/Ansatz liegen deutlich erhöhte Sauerstoffwerte vor. In diesem Gebiet sind Konkurrenzreaktionen zwischen dem Wasserstoffdonator und dem Wasserstoffperoxid am Enzym-Substrat-Komplex denkbar. Im Reaktionsansatz 9, also bei 57,5 IE Katalase pro Ansatz, sind beide Reaktionen zu 50% an der gesamten katalytischen Funktion der Katalase beteiligt.

Aus Abb. 12 wird der Anteil der peroxydatischen Reaktion an der Gesamtreaktion ermittelt. Die Abhängigkeit der peroxydatischen Reaktion von der Katalase-Konzentration ist in Abb. 13 dargestellt.

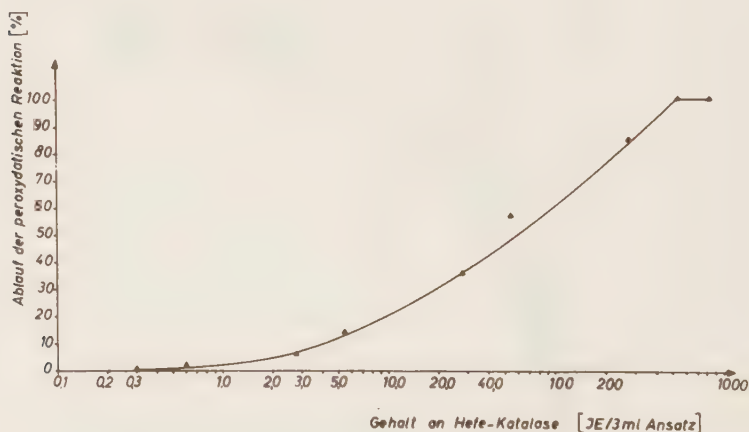


Abb. 13: Anteil der peroxydatischen Reaktion an der Gesamtreaktion für verschiedene Katalase-Konzentrationen

Aus dieser Abbildung geht hervor, daß die Katalase-aktivitäten für die peroxydatische Reaktion etwa 2000mal größer sein müssen als für die katalatische. Bei der Leberkatalase ist der entsprechende Faktor um etwa die Hälfte kleiner (7). Für Katalasen anderer Herkunft liegen keine Vergleichswerte vor.

3.4.4 Abhängigkeit der peroxydatischen Wirkung von der Substratkonzentration

Aus Abschnitt 3.4.2 ist hervorgegangen, daß die peroxydatische Wirkung der Katalase von der stationären Wasserstoffperoxidkonzentration abhängig ist. Die Erzeugung von Wasserstoffperoxid in einem primären Enzymsystem war Voraussetzung für den Ablauf der peroxydatischen Reaktion.

Im folgenden wird untersucht, ob durch unterschiedliche stationäre Wasserstoffperoxidkonzentration, auch wenn diese enzymatisch erzeugt wird, ebenfalls eine Beeinflussung der Katalase in ihrer Funktionsweise erfolgen kann. Durch Veränderungen im GOD-System wird die Substratkonzentration variiert. In Vorversuchen wurde die Abhängigkeit der Wasserstoffperoxid-Entwicklung von der GOD-Konzentration untersucht. Die Ausführung dieser Vorversuche erfolgte, indem in der Warburg-Apparatur alle Gefäße mit Glucose-Lösung gleicher Konzentration aber mit steigender GOD-Menge beschickt wurden. Unter Berücksichtigung des einheitlichen Volumens wurde die Reaktion bei 25 Grad Celsius ausgeführt.

Der gemäß Gl.6 pro Zeiteinheit verbrauchte Sauerstoff war der gebildeten Menge Wasserstoffperoxid direkt proportional. Mit steigender GOD-Konzentration nahm erwartungsgemäß der Sauerstoffverbrauch zu, was einer Wasserstoffperoxidbildung entspricht. Eine quantitative Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration wäre jedoch sinnlos, da bei der folgenden Untersuchung die Katalase das entwickelte Peroxid jeweils sofort wieder aus dem Gleichgewicht entfernt, die Reaktion also ganz anders abläuft und es sich demnach nur um eine zeitlich unabhängige stationäre Wasserstoffperoxidkonzentration handelt. CHANCE (51) hat für ein solches System eine Konzentration des freien Wasserstoffperoxids von etwa $10^{-9}M$ berechnet.

Die Ergebnisse der Vorversuche rechtfertigen es, das peroxydatische Verhalten der Katalase bei verschiedenen Substratkonzentrationen durch Veränderung der GOD-Konzentration zu untersuchen.

In der Versuchsausführung wurde als Wasserstoffdonator eine Lösung von 5 mg Äthanol/ml bidest. Wasser verwendet. Als Katalase diente die in Tab. 10, Probe 11 beschriebene Enzymkonzentration. Die Glucose wurde als 1,5%ige Lösung in bidest. Wasser eingesetzt. GOD wurde in einer Lösung der Konzentration 1 mg/ml Tris-Puffer angesetzt, von der dann unterschiedliche Volumina zur Reaktion verwendet wurden. Zum Vergleich wurden zwei Reaktionen mit unterschiedlichem GOD-Gehalt ohne Wasserstoffdonator ausgeführt. Die Versuchsansätze sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Probe	Äthanol	Glucose (ml)	GOD		Katalase (ml)	Tris-Puffer (ml)
	(ml)		(ml)	(mg)		
1	-	0,20	0,25	0,25	0,5	2,05
2	-	0,20	0,05	0,05	0,5	2,25
3	0,46	0,20	0,50	0,50	0,5	1,34
4	0,46	0,20	0,25	0,25	0,5	1,59
5	0,46	0,20	0,10	0,10	0,5	1,74
6	0,46	0,20	0,05	0,05	0,5	1,79

Tab. 12: Versuchsansätze für die manometrischen Messungen zur Untersuchung der Abhängigkeit des Sauerstoffumsatzes von der Substratkonzentration.
0,46 ml Äthanol obiger Konzentration entsprechen 50 μ Mol Äthanol.

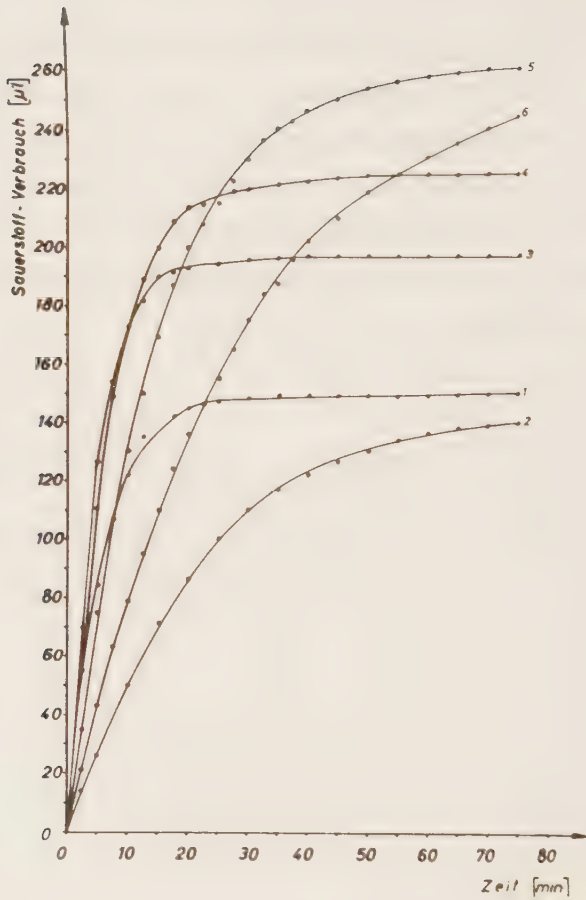


Abb. 14: Manometrische Untersuchungen der Katalase-reaktion im GOD-System in Gegenwart von Athanol für verschiedene Substratkonzentrationen

In Abb. 14 zeigen alle Reaktionsansätze, die Äthanol enthalten, einen erhöhten Sauerstoffverbrauch. Die Kurve 6 für den Ansatz mit dem geringsten GOD-Gehalt (0,05 mg) hat bei Abbruch des Versuchs den horizontalen Bereich noch nicht erreicht. Dennoch ist als Folge der geringen GOD-Konzentration nach 80 Minuten Versuchsdauer der Glucosevorrat noch nicht erschöpft. Die stationäre Wasserstoffperoxidkonzentration ist also während der gesamten Versuchsdauer ausserordentlich gering gewesen. Der extrapolierbare hohe Endwert im Sauerstoffverbrauch zeigt, daß unter den gewählten Bedingungen die Hefekatalase eindeutig quantitativ peroxydatische Funktion angenommen hat.

In der Kurve 5, die die Reaktion unter Verwendung von 0,1 mg GOD pro Ansatz wiedergibt, liegen die Verhältnisse ähnlich wie in Versuch 6, jedoch ist als Folge der höheren GOD-Konzentration hier der Glucosevorrat während des Versuchs erschöpft und somit die Sauerstoff verbrauchende Primerreaktion beendet. Die manometrisch bestimmten Sauerstoffendwerte entsprechen fast dem Doppelten der in den katalatischen Reaktionen 1 und 2 ermittelten Werte. Auch in den Bedingungen, wie sie in Versuchsansatz 5 vorliegen, ist die katalatische Reaktion der Hefekatalase zugunsten der peroxydatischen verdrängt worden.

Die Kurven 3 und 4 hingegen zeigen eine veränderte Kinetik. In beiden Fällen ist vorzeitig ein Plateau erreicht worden. Die zehnfach erhöhte GOD-Konzentration im

Versuchsansatz 3 (im Vergleich zu 6) liefert eine relativ hohe stationäre Wasserstoffperoxidkonzentration zu Beginn der Reaktion. 50% des Glucosevorrats sind in weniger als 5 Minuten verbraucht worden. Durch das demnach erhöhte Substratangebot ist hier der Katalase Gelegenheit gegeben, gemäß der katalatischen Reaktion zu reagieren, wenngleich durch die erhöhten Sauerstoffverbrauchswerte auch hier gleichzeitig eine peroxydatische Reaktion angezeigt ist. Beide Reaktionstypen, der peroxydatische wie der katalatische, liegen in den Versuchsansätzen 3 und 4 nebeneinander vor.

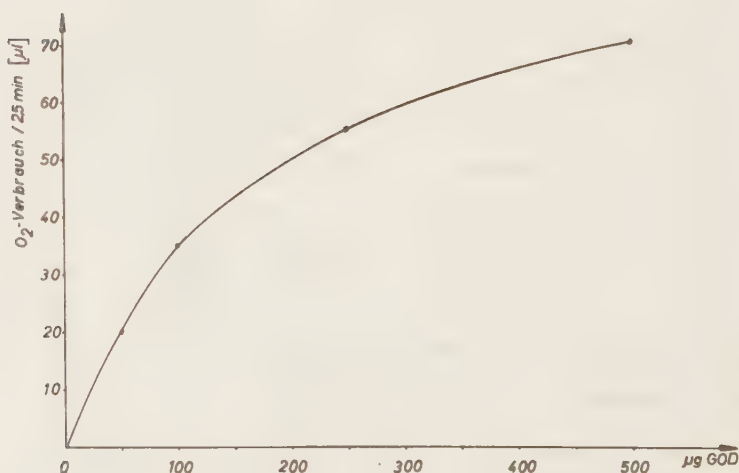


Abb. 15: Sauerstoffverbrauch (gemäß Abb. 14) innerhalb der ersten 2,5 Minuten in Anhängigkeit von der GOD-Konzentration

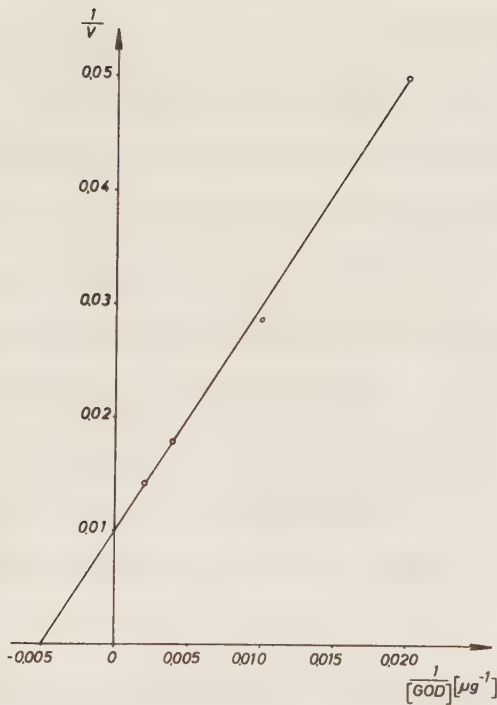


Abb. 16: Lineweaver-Burk-Beziehung für die Substratabhängigkeit der Reaktion

Nach Abbruch der Versuche konnte in keinem der Reaktionssysteme Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. Die Katalase hat also bis zum Versuchsabbruch reagiert.

Aus den Untersuchungen über die Reaktion der Hefekatalase in Gegenwart von Äthanol wird deutlich, daß mit abnehmender Substratkonzentration die Katalase zunehmende peroxydatische Wirkung zeigt.

Die Änderung der Kinetik während der Reaktion ist deutlich und bewirkt die Schnittpunkte der Kurven (Abb. 14). Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der Reaktionen 3 - 6 ist nur innerhalb des linearen Bereichs möglich. Hier gibt der Sauerstoffverbrauch in den ersten 2,5 Minuten ein vergleichbares Maß und zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der GOD-Konzentration (Abb. 15). In Abb. 16 sind die Versuchsergebnisse nach der Lineweaver-Burk-Methode (52) ausgewertet. Im Verlauf der Geraden ist keine Abweichung von der Linearität ersichtlich, was die Aussage gestattet, daß in diesem Konzentrationsbereich noch keine Substrathemmung vorliegt.

3.4.5 Die Reaktionsprodukte der peroxydatischen Reaktion

Wie in 3.4.1 beschrieben, ist Acetaldehyd das Endprodukt der peroxydatischen Reaktion der Leberkatalase, wenn die Reaktion in Gegenwart von Äthanol durchgeführt wird. Unter Verwendung von Methanol als Wasserstoffdonator verläuft die Oxydation über die Aldehydstufe zur Ameisensäure und zum Kohlendioxid (6) (7). In der folgenden Unter-

suchung soll geklärt werden, inwieweit die Hefekatalase in ihrer peroxydatischen Eigenschaft mit der von KEILIN und HARTREE untersuchten animalischen Katalase vergleichbar ist. Aus diesem Grunde soll eine Bestimmung des Acetaldehyds und des nicht umgesetzten Äthanolis erfolgen. Aus dem Vergleich der Mengen des umgesetzten Alkohols und des entstandenen Acetaldehyds können Schlüsse auf die Einheitlichkeit des Reaktionsproduktes gezogen werden. Wenn die Summe aus gebildetem Aldehyd und nicht umgesetztem Äthanol der eingesetzten Alkoholmenge entsprechen, kann gefolgert werden, daß auch bei der Hefekatalase kein höheres Oxydationsprodukt im Zuge dieser Reaktion gebildet wird. Aus diesem Grunde soll der Acetaldehyd, wie er unter verschiedenen Reaktionsbedingungen gebildet worden ist, bestimmt werden, und gleichzeitig der dazu gehörige Äthanolwert erfaßt werden. KEILIN und HARTREE führten ihre Aldehydbestimmungen mit fuchsinschwefliger Säure durch. Im Zuge der vorliegenden Arbeit soll die Bestimmung enzymatisch nach der ADH-Methode (53) durchgeführt werden, wobei sowohl der Aldehyd- als auch der Alkoholgehalt bestimmbar ist.



+) ADH = Alkoholdehydrogenase
NAD = Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH = reduzierte Form von NAD

3.4.5.1 Untersuchung des bei der peroxydatischen Reaktion entstandenen Aldehyds

Zur Vermeidung von Aldehydverlusten muß die peroxydatische Reaktion bei tiefen Temperaturen ausgeführt werden, da andernfalls durch Verdampfen des Aldehyds erhebliche Fehler die Ergebnisse verfälschen würden.

In einem auf 0 Grad Celsius thermostatisierten Bad wurden in einem kleinen Erlenmeyerkolben 0,92 ml (0,1 mMol) wäßrige Äthanol-Lösung, 0,4 ml 1,5%ige Glucoselösung und 0,5 ml Lösung aus Katalase der Anreicherungsstufe VI, mit Tris-Puffer im Verhältnis 1:1 verdünnt (1150 IE/ml), gut temperiert. Diese Mischung wurde mit Tris-Puffer, der zuvor im Eisbad mit reinem Sauerstoff gesättigt wurde, auf 5 ml aufgefüllt. Durch Zusatz von 1 ml GOD-Lösung (0,1 mg/ml Puffer) wurde nach gutem Durchmischen die Reaktion gestartet. Das Reaktionsgefäß war während der Reaktion gut verschlossen. In Parallelversuchen wurde der Abbruch der Enzymreaktion zu verschiedenen Zeiten durch Zugabe von 6 ml eiskalter Perchlorsäurelösung (3,5%) bewirkt. Die gut durchmischte, denaturierte Reaktionslösung wurde mit 5000 U/min bei -5 Grad Celsius 10 Minuten zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 2 ml entnommen und zu 0,7 ml eiskalter 1,1 M- K_2HPO_4 -Lösung gegeben. Zur Vervollständigung der Fällung wurde über 10 Minuten im Eisbad stehen gelassen und dann mit 5000 U/min bei -5 Grad Celsius über 10 Minuten zentrifugiert. In diesem Überstand wurde nach der ADH-Methode der Acetaldehydgehalt spektralphoto-

metrisch bestimmt. Dazu wurden 2 ml Überstand und 0,05 ml 8 mM-NADH-Lösung in eine 1 cm-Glasküvette pipettiert und die Extinktion bei 340 nm gemessen. Danach wurden 0,05 ml ADH-Suspension (10 mg ADH/ml) in die Küvette gemischt und nach 5 Minuten wieder die Extinktion gemessen. In Abständen von je 1 Minute wurden die Extinktionsmessungen fortgesetzt, bis ein konstanter Endwert erreicht war. Die aus den Messungen sich ergebenden Aldehydwerte sind in Tab. 12 zusammengefaßt.

3.4.5.2 Bestimmung des in der peroxydatischen Reaktion nicht umgesetzten Äthanols

Aus dem Überstand der Enteiweißung mit Perchlorsäure wurde zu jeder Probe der Alkoholgehalt ermittelt. Gearbeitet wurde nach der "Boehringer-Testvorschrift-Blutalkohol". In ein Reagenzglas wurden nacheinander pipettiert: 4,70 ml Puffer (wie folgt bereitet: 10 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 g Semicarbazid $\cdot\text{HCl}$, 0,5 g Glycin in 200 ml Wasser lösen, mit 10 ml 2 N-NaOH versetzen, mit Wasser auf 300 ml auffüllen), 0,20 ml NAD-Lösung ($2,4 \cdot 10^{-2}$ M-NAD in 2,85 ml Wasser), 0,10 ml enteweißter Überstand der Probelösung und 0,02 ml ADH-Suspension (30 mg Enzymprotein pro ml). Die gut durchmischte Reaktionslösung wurde 70 Minuten bei 25 Grad Celsius inkubiert und dann gegen den Reagentien-Leerwert bei 366 nm spektralphotometrisch gemessen. Zu den gemessenen Extinktionen wurden anhand

einer Eichkurve die Alkoholkonzentrationen ermittelt. Für die Herstellung der Eichkurve wurden Alkoholstandard-Lösungen (Merck) verwendet. Die in Abhängigkeit von der Reaktionszeit für die peroxydatische Reaktion bestimmten Alkoholwerte wurden in Tab. 12 zusammengefaßt und mit den dazugehörigen Aldehydwerten verglichen.

t (min)	CH ₃ CHO (μMol)	Restalkohol (μMol)	Summe (μMol)
5	5,3	92,1	97,4
10	11,1	86,6	97,7
20	16,8	80,7	97,5
30	24,4	73,9	98,3
40	26,7	70,5	97,2
50	29,3	66,8	96,1
60	32,3	65,0	97,3
70	33,8	63,5	97,2
80	34,6	61,5	96,1
90	37,4	60,8	98,2
100	37,9	59,7	97,6

Tab. 13: Gegenüberstellung von entstandenem Acetaldehyd und nicht umgesetztem Äthanol in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die eingesetzte Menge Äthanol entspricht 100 μMol.

Die Summe aus dem pro Ansatz gebildeten Acetaldehyd und dem ermittelten Restalkoholgehalt entspricht der Menge des eingesetzten Alkohols mit einer Abweichung von etwa 3%. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß auch bei der durch Hefekatalase katalysierten Äthanol-oxydation die Stufe des Aldehyds nicht überschritten wird.

4 Diskussion

=====

Bei einem Vergleich des Katalasepräparates, das nach der kombinierten Methode von fraktionierter Fällung und Säulenchromatographie gewonnen wurde, mit dem von MITSUDA u.a. (13) erarbeiteten Enzym fällt auf, daß die spezifische Aktivität von 19 300 IE erheblich unterhalb der von MITSUDA u.a. beschrieben liegt. Mit der für die vorliegende Arbeit verwendeten Hefe konnte aber auch durch Anreicherung nach dem Mitsuda-Verfahren nicht die von diesen Autoren benannte Aktivität erzielt werden. Im Verlauf der Anreicherung erfolgte in der Stufe der Dioxan-Fraktionierung sogar häufig Aktivitätsverlust. Das Extinktionsverhältnis $E_{280}:E_{408}$, das als Maß für die Reinheit der Katalase gilt, zeigte im vorliegenden Präparat den Wert 2,7. Dies deutet auf eine Reinheit von etwa 53% hin, wenn nach MITSUDA der Wert von 1,43 für absolut reine Hefekatalase zugrunde gelegt werden kann. Der von MITSUDA ermittelte Quotient für sein Präparat von 80%iger Reinheit lag bei 1,79. BROWN erzielte nach seinem Verfahren nur eine 20%ige Reinheit.

Im Zuge der Aktivitätsuntersuchungen bestätigte sich, daß die Hefekatalase in ihrer Aktivität ganz erheblich unterhalb der bekannten Werte für die animalischen und bakteriellen Katalasen liegt.

In Bezug auf die Stabilität erwies sich das vorliegende Katalasepräparat dem von BROWN erzielten überlegen, das

bereits 20% seiner Aktivität innerhalb von 3 Stunden durch Aufbewahren bei 4 Grad Celsius und pH 7 einbüßte. Aufgrund dieser von BROWN gemachten Aussage ist in der Literatur häufig die Ansicht vertreten, daß die Hefekatalase ein außerordentlich instabiles Enzym sei. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die von MITSUDA u.a. getroffene Feststellung bestätigt werden, daß diese Ansicht nicht unbedingt zutreffend ist. Wenn die Hefekatalase auch empfindlicher als die anderen bisher untersuchten Katalasen ist, so ist sie dennoch durchaus experimentell zu handhaben. Die vergleichsweise geringe Stabilität zeigt sich z.B. bei der Einwirkung von höheren Temperaturen. Wie SCOTT und HAMMER (10) gezeigt haben, weist die *Aspergillus niger*-Katalase bei 40 Grad Celsius nach 20 Minuten noch 40% ihrer bei 25 Grad Celsius standardisierten Aktivität auf, während die Hefekatalase unter gleichen Bedingungen praktisch inaktiv ist.

Bei der Betrachtung des pH-Optimums ist dessen Breite auffällig. Während für Leberkatalase das Optimum zwischen pH 6,8 und 7,0 liegt (10, 27, 18), reicht es bei der Hefekatalase von 5,9 bis 9,5. Die *A. niger*-Katalase zeigt zwischen pH 2 und 7 ihre optimale Wirkung (10); sie ist also wie die Hefekatalase durch ein sehr breites pH-Optimum charakterisiert.

Gegenüber Inhibitoren wie beispielsweise Kaliumcyanid, ist die Hefekatalase so empfindlich, daß sie durch $5,5 \cdot 10^{-5}$ M-KCN zu 50% in ihrer Aktivität gemindert wird. Dahingegen

wird Leberkatalase erst durch eine Cyanidkonzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l im Substrat um den entsprechenden Wert gehemmt.

Die höhere Empfindlichkeit der Hefekatalase gegenüber Inhibitoren, sowie auch Beeinflussung durch Temperatur, sind Eigenschaften, die dieses Enzym von Katalase anderer Herkunft unterscheiden und vielleicht ihre Ursache in dem höheren Molekulargewicht der Hefekatalase haben. Die Unterschiede im Proteinanteil des Enzyms bedingen eine unterschiedliche Tertiärstruktur und somit eine unterschiedliche Stabilität des Enzyms.

Aus der Untersuchung der peroxydatischen Reaktion der Hefekatalase hat sich ergeben, daß für diese Funktionsweise die Katalasekonzentration etwa 2000mal größer sein muss als für die katalatische. Bei der Leberkatalase wird dieser Faktor mit 1000 angegeben (7), er ist dort also um die Hälfte kleiner. Für Bakterienkatalasen, die ebenfalls die peroxydatische Reaktion katalysieren, wurden diese Faktoren bisher noch nicht bestimmt.

Die Untersuchung der bei der peroxydatischen Reaktion auftretenden Produkte hat ergeben, daß auch bei der durch Hefekatalase katalysierten Reaktion kein höheres Oxydationsprodukt auftritt.

Die Hefekatalase zeigt gegenüber den anderen Katalasen zum Teil erhebliche quantitative Unterschiede. In qualitativer Beziehung liegen bei ihr keine abweichenden Eigenschaften vor. Die Hefekatalase fügt sich in die Reihe der bisher

untersuchten animalischen und mikrobiellen Katalasen ein.

Die Frage, in welcher Reaktionsweise die Katalase in der Zelle reagiert, ist bisher keineswegs eindeutig geklärt worden. Es darf allerdings nach dem heutigen Stand der Kenntnisse behauptet werden, daß die Zersetzung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff nicht die einzige Funktion der Katalase, sowohl in animalischen Zeilen als auch in Mikroorganismen sein kann (7). Es darf sogar bezweifelt werden, daß die katalatische Reaktion in vivo überhaupt abläuft. Denn in den Zellen sind allgemein die biogenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen so gering, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der peroxydatischen Reaktion bei weitem für die volle Umsetzung des Substrats ausreicht (54, 55). Demnach kann es niemals zu einem Wasserstoffperoxid-Stau kommen, der erst eine katalatische Wirkungsweise erforderlich machen würde. Außerdem wäre vom energetischen Standpunkt die katalatische Reaktion absolut unökonomisch, sie wäre eine unnatürliche Energieverschwendung der Zelle.

Seit den Arbeiten von KEILIN und HARTREE wurden der Katalase erhebliche Schutzfunktionen gegen verschiedene Zellgifte zugeordnet, wie z.B. Oxydation von Methanol, Äthanol, Formiat, Nitrit und Phenol. Die weite Verbreitung der Katalase förderte diese Ansicht. In neuerer Zeit bezweifelt man die ausschließlich negative Funktion der Katalase und glaubt, sie in verschiedene Stoffwechsel-

vorgänge einordnen zu können, wie z.B. in den Protein-
stoffwechsel (56)(57); den Tyrosinstoffwechsel (58), den
Thyroxinabbau (59)(60) und in den Glucosestoffwechsel (61).
Am Glucosestoffwechsel ist die Katalase durch die Oxy-
dation von Ribose-5-phosphat beteiligt. Durch diese Kata-
lyse könnte aber auch ein Zusammenhang mit dem Nuclein-
säurestoffwechsel gegeben sein.

5 Zusammenfassung

Aus Trockenhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde durch Extraktion mit Tris/HCl- Puffer (pH 7,2) ein katalaseaktiver Rohextrakt gewonnen, in dem durch Fraktionierung mit Ammonsulfat und Fällung mit Aceton eine Zunahme der spezifischen Aktivität erzielt werden konnte. Ein stark angereichertes Produkt konnte durch anschließende Säulenchromatographie auf Sephadex-G-200 und DEAE-Cellulose mit Konzentrationsgradienten erhalten werden. Dabei konnte ein Enzympräparat mit der spezifischen Aktivität von 19 300 IE/mg erhalten werden. Dieses Verfahren erwies sich als erheblich schonender im Vergleich zu den bekannten Methoden, bei denen in bestimmten Reinigungsschritten stets eine wesentliche Denaturierungsgefahr bestand.

Das angereicherte Enzym zeigte unter normalen Bedingungen (Aufbewahren bei 4 Grad Celsius im Kühlschrank) innerhalb einer Woche keine Aktivitätsverluste.

Die Thermostabilität wurde im Bereich zwischen 25 und 45 Grad Celsius untersucht und mit der von *Aspergillus-niger*-Katalase (10) verglichen. Dabei wurde deutlich, daß die Hefekatalase unter vergleichbaren Bedingungen die geringere Thermostabilität besaß.

Das pH-Optimum wurde im Bereich von pH 3 bis pH 12,9

untersucht und gefunden, daß die Hefekatalase über einen erheblich breiten optimalen pH-Bereich verfügt. Außerdem wurde die Reversibilität der Aktivität von Katalase nach Verweilen in extremen pH-Bereichen untersucht.

Aufgrund der Zeit-Umsatz-Kurve wurde die cyanidgehemmte Katalasereaktion betrachtet und die Reaktivierung durch Silberionen untersucht. Um die Hemmung durch Hydroxylamin zu prüfen, wurde der Hemmungsgrad in Abhängigkeit von der Hydroxylamin-Konzentration bestimmt und die Halbwertschemmung ermittelt.

In Gegenwart von Äthanol wurde der Reaktionsverlauf der Hefekatalase mit Wasserstoffperoxid verfolgt. Dabei wurde unterschieden, ob das Wasserstoffperoxid direkt in Lösung zugesetzt, als Perborat zugegeben oder im Reaktionssystem aus Glucoseoxydase und Glucose unmittelbar erzeugt wurde. Die manometrisch erhaltenen Versuchsergebnisse zeigen eindeutig, daß die Katalase nur im letzten Fall nach dem peroxydatischen Mechanismus reagiert, d.h., daß nicht Wasser und Sauerstoff als Produkte auftreten, sondern Acetaldehyd als Oxydationsprodukt des Äthanol. Die peroxydatische Reaktion wurde eingehend in Abhängigkeit von der Katalase- bzw. Substratkonzentration untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß durch die Konzentration bedingte Übergänge zwischen der katalatischen und der peroxydatischen Reaktion vorliegen. Als Voraussetzung für die peroxydatische Wirkung der Hefekatalase konnten hohe Enzymkonzentration und niedrige Substratkonzentration erkannt werden.

Nach Ablauf der peroxydatischen Reaktion wurde sowohl der Acetaldehyd-Gehalt als auch der Äthanol-Gehalt enzymatisch nach der Alkoholdehydrogenase-Methode bestimmt. Aus der Summe (Restalkohol plus Aldehyd) ergab sich eine Übereinstimmung mit den eingesetzten Äthanolmengen. Somit konnte der Acetaldehyd als einheitliches Oxydationsprodukt des Äthanol identifiziert werden und die Existenz eines höheren Oxydationsproduktes ausgeschlossen werden.

Anhand der untersuchten Eigenschaften wurde die Hefekatalase mit anderen Katalasen verglichen und dabei festgestellt, daß zum Teil erhebliche quantitative Unterschiede bestehen, in qualitativer Beziehung jedoch keine Abweichungen von bekannten Katalase-Eigenschaften vorliegen. Die Hefekatalase fügt sich in die Reihe der untersuchten animalischen und bakteriellen Katalasen ein.

6 Literaturverzeichnis

1. RAUDNITZ, R.; Zbl.Physiol. 12, 790 (1899)
2. LOEW, O.; U.S.Dept.Agr.Report Nr. 68 (1901)
3. CHANCE, B.; Acta chem.scand. 1, 236 (1947)
4. ZEILE, K. und HELLSTROEM, H.; Z.physiol.Chem. 192, 171 (1930)
5. STERN, K.G.; J.Biol.Chem. 112, 661 (1935/36)
6. KEILIN, D. und HARTREE, E.F.; Proc.Roy.Soc. B121, 173 (1936)
7. KEILIN, D. und HARTREE, E.F.; Biochem.J. 39, 293 (1945)
8. HERBERT, D. und PINSENT, J.; Biochem.J. 43, 193 (1948)
9. CLAYTON, R.; Biochem. Biophys.Acta 26, 40 (1959)
10. SCOTT, D. und HAMMER, F.; Enzymologia 22, 229 (1960)
11. v. EULER, H., FINK, H. und HELLSTROEM, H.; Z.physiol.
Chem. 169, 10 (1927)
12. BROWN, G.L.; Acta chem.scand. 7, 435 (1953)
13. MITSUDA, H., KAWAI, F., HAYAMIZU, T. und YASUMOTO, K.;
Bull.Inst.chem.Res.Kyoto, Univ. 37, 8 (1959)
14. SUMNER, J.B. und DOUNCE, A.L.; J.Biol.Chem. 127, 439 (1939)
15. SUMNER, J.B. DOUNCE, A.L. und FRAMPTON, O.D.; J.Biol.
Chem. 136, 343 (1940)
16. BONNICHSEN, R.K.; Arch.Biochem.Biophys. 12, 83 (1947)
17. AGNER, K.; Biochem.J. 32, 1702 (1938)
18. AGNER, K. und THEORELL, H.; Arch.Biochem.Biophys. 10,
321 (1946)
19. HERBERT, D. und PINSENT, J.; Biochem.J. 43, 203 (1948)
20. FLODIN P.: Dextran gels and their applications in gel
filtration, Pharmacia, Uppsala, Schweden 1962
21. Pharmacia, Uppsala, Schweden; Literature References 1967
22. Pharmacia, Uppsala, Schweden; Literature References 1968
23. AEBI, H., SCHNEIDER, C.H., GANG, H. und WIESMANN, U.;
Experientia 20, 103 (1964)

24. MITZ, M.A. und YANARI, S.S.; J.Am.chem.Soc. 78, 2649 (1956)
25. HIGASHI, T. und PETERS, Jr., T.; J.Biol.Chem. 238, 3945 (1963)
26. v. EULER, H. und JOSEPHSON, K.; Ann. 452, 158 (1927)
27. BONNICHSEN, R.K., CHANCE, B. und THEORELL, H.; Acta chem.scand. 1, 685 (1947)
28. BERGMAYER, H.U.; Biochem.Z. 327, 255 (1955)
29. BEERS, R.F. und SIZER, I.W.; J.Biol.Chem. 195, 133 (1952)
30. CHANCE, B.; J.Biol.Chem. 179, 1299 (1949)
31. HUEBL, P. und BRETSCHNEIDER, R.; Z.physiol.Chem. 355, 164 (1964)
32. PUETTER, J.; Z.physiol.Chem. 329, 40 (1962)
33. JANICEK, G. und POKORNY, J.; Chem.Listy 49, 1315 (1955)
34. PILZ, W. und JOHANN, I.; Z.analyt.Chem. 210, 358 (1965)
35. FEINSTEIN, R.N.; J.Biol.Chem. 180, 1197 (1949)
36. COOPER, J., SRERE, P.A., TABACHNIK, H. und RACKER, E.; Arch. Biochem.Biophys. 74, 306 (1958)
37. LUECK, H. in H.U. BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 891, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962
38. Boehringer-Informationen "Kat", August 1962
39. BUECHER, T.; Z.Naturforschung 8b, 576 (1953)
40. WARBURG, O. und CHRISTIAN, W.; Biochem.Z. 310, 384 (1941)
41. DREWS, B., SPECHT, H. und MOELLER, P.; Naturwiss. 53, 710 (1966)
42. LUECK, H.; Biochem.Z. 328, 411 (1957)
43. BOND, J. und COOPER, J.G.; Nature 191, 385 (1961)
44. CHANCE, B.; J.Biol.Chem. 194, 483 (1952)
45. SARKAR, N.K. und SUMNER, J.B.; Enzymologia 14, 280 (1951)
46. FLODIN, P.; J. Chromatog. 5, 103 (1961)
47. KEILIN, D. und HARTREE, E.F.; Biochem.J. 49, 88 (1951)

48. KALCKAR, H.M.; J.Biol.Chem. 167, 461 (1947)
49. BAKER, D.L.; U.S.-Patent 2 635 069 (1953)
50. NICHOLLS, P.; Biochem.J. 90, 331 (1964)
51. CHANCE, B.; Biochem.J. 46, 387 (1950)
52. LINEWEAVER, H. und BURK, D.; J.Am.chem.Soc. 56, 658 (1934)
53. BERGMEYER, H.U.; Methoden der enzymatischen Analyse,
Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 290
54. AGNER, K.; Acta physiol.Scand. 13, 87 (1947)
55. THEORELL, H.; Experientia 4, 100 (1948)
56. MOSEBACH, D.O. und DIRSCHERL, W.; Chem.Ber. 90, 922 (1957)
57. v. PILSUM, J.F., SPEYER, J.F. und SAMUELS, L.T.; Arch.
Biochem.Biophys. 68, 142 (1957)
58. LA DU, B. und ZANNONI, V.C.; Nature 177, 574 (1956)
59. GALTON, V.A. und INGBAR, S.H.; Endocrinology 73, 596 (1963)
60. GALTON, V.A. und INGBAR, S.H.; Endocrinology 74, 627 (1964)
61. FRANCOEUR, M. und DENSTEDT, O.F.; Can.J.Biochem.Physiol. 32,
644 (1954)

Herrn Professor Dr.Dr.h.c. B. Drews
danke ich für die Förderung und
das freundliche Interesse an dieser
Arbeit.

Diese Arbeit wurde vom Bundeswirtschafts-
ministerium durch Vermittlung der Ar-
beitsgemeinschaft Industrieller For-
schung e.V. finanziert. Den dafür Ver-
antwortlichen gilt an dieser Stelle
mein Dank.

Lebenslauf

=====

Am 14. März 1931 wurde ich als Sohn des Friseurmeisters Gustav Moeller und dessen Ehefrau Minna, geb. Döscher, in Güstrow in Mecklenburg geboren.

Von 1937 bis 1941 besuchte ich die Grundschule in Güstrow.

Ab 1941 war ich Schüler der John-Brinkman-Schule in Güstrow, an der ich 1950 das Abitur bestand.

Zum Sommersemester 1957 begann ich mit dem Chemiestudium an der Freien Universität Berlin. Im Sommer 1963 legte ich meine mündliche Prüfung zum Diplom-Hauptexamen ab.

Anschließend fertigte ich im Institut für Organische Chemie unter der Leitung der Herren Professoren Lautsch und Manecke eine Diplomarbeit an. Im Januar 1965 schloß ich als Diplom-Chemiker mein Studium ab.

Seit April 1965 bin ich im Institut für Gärungsgewerbe mit der Ausführung eines Forschungsauftrages beschäftigt. Dabei entstand unter der Leitung von Herrn Professor Dr.Dr.h.c. B. D r e w s die vorliegende Dissertation.

